

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

RAFAEL CEDRO DE SOUZA SANDOVAL

MARCADORES MOLECULARES COMO
FERRAMENTAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
DÍPTEROS DE IMPORTÂNCIA FORENSE
(CALLIPHORIDAE, MUSCIDAE).

CURITIBA
2011

RAFAEL CEDRO DE SOUZA SANDOVAL

MARCADORES MOLECULARES COMO
FERRAMENTAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
DÍPTEROS DE IMPORTÂNCIA FORENSE
(CALLIPHORIDAE, MUSCIDAE).

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção de Título de Mestre em Ciências Biológicas (Entomologia).

Orientador: Prof. Dr. Claudio José Barros de Carvalho

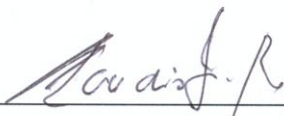
Co-Orientador: Prof. Dr. Walter Antônio Pereira Boeger

CURITIBA
2011

RAFAEL CEDRO DE SOUZA SANDOVAL

“MARCADORES MOLECULARES COMO FERRAMENTAS PARA A
IDENTIFICAÇÃO DE DIPTEROS DE IMPORTÂNCIA FORENSE
(CALLIPHORIDAE, MUSCIDAE)”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Claudio José Barros de Carvalho (Orientador)
(UFPR)



Profa. Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen
(UFPR)



Mário Antonio Navarro da Silva
(UFPR)

Curitiba, 24 de fevereiro de 2011.

*“O avarento alimentará os
mesmos vermes que irão consumir
aquele miserável que ele enxotou
quando lhe pediu alimento, porém,
estes vermes, mais sábios, não o
discriminarão como alimento.”*

Ivan Teorilang

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar vivo e ter me dado o privilégio de poder continuar meus estudos, em segundo lugar à minha mãe Ivone e a toda minha família pelo apoio e motivação durante todo o tempo que estive na Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

Ao Prof. Dr. Claudio J.B. de Carvalho, meu orientador, pela oportunidade, incentivo e motivação para realizar este trabalho, além de todos os ensinamentos durante o Mestrado, as broncas (risos) e as horas de descontração nos “chás das 5” acadêmicos e festivos.

Ao meu co-orientador, Walter A.P. Boeger, por todo o apoio na parte molecular, os ensinamentos com os programas e explicações nas análises, e a todos os integrantes do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE) da UFPR, em especial à Luciana, ao Marlus e ao Rodrigo pela ajuda na utilização dos equipamentos e o alinhamento das sequências.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal do Paraná por todo o aprendizado e experiências que adquiri nesses dois anos, a todos os professores e funcionários do departamento de Zoologia, em especial aos professores Dr. Gabriel A.R. Melo e Dra. Lúcia M. de Almeida e seus respectivos laboratórios, pela ajuda na cessão do material para o sequenciamento das amostras e à Dra. Paula A.F. Borges, técnica do Laboratório de Biologia Molecular Danúncia Urban por toda a ajuda com os procedimentos e equipamentos utilizados para a realização do presente trabalho.

A MSc. Cecília Kosmann por toda a paciência em me ensinar os procedimentos, materiais e protocolos utilizados nas extrações, PCRs, purificações e sequenciamentos das amostras objetos de estudo do trabalho, além de todas as dicas que me ajudaram a obter sucesso em toda a parte molecular.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biodiversidade e Biogeografia de Diptera pelo companheirismo, sugestões e críticas que ajudaram a enriquecer o trabalho: Diana Grisales, Alessandre P. Colavite, Danilo P. Cordeiro, Kirstern L. F. Haseyama, André C. L. da Silva, Kiany T. de Mira, Lyvia R. Boutin e em especial a minhas duas colegas de turma e amigas:

Beatriz E. da Silveira e Karine P. Vairo pela ajuda nas coletas e as horas de diversão, brigas (risos) e descontração durante a realização dos experimentos.

A todos meus amigos e colegas de turma, dos quais nunca vou esquecer e fizeram e já fazem parte da minha vida acadêmica: Carla Piccoli (amiga muito especial), Laércio Neto (inesquecíveis horas de vídeo-game), Diego Dolibaina, Selene Leite, Daiara Manfio, Grazielle Weiss, David da Luz, Isabel de Assumpção, Daniel Moura, Marcel Tschá e aos colegas de sala e corredores Débora, Kléber, Rodrigo, Fernando, Luís Anderson, Leandro, Melise, Andressa, Lígia, Jéssica, e a todos aqueles que tiveram contato comigo durante esses dois anos na Entomologia da UFPR, vou sentir saudades de todos vocês!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa.

A todos que não estão com nome aqui, mas contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Entomologia Forense: Importância e aplicações em casos de morte violenta.....	1
1.2. Calliphoridae e Muscidae: Características gerais e importância na área forense.	2
1.3. Os desafios da identificação nas espécies de interesse forense.	3
1.4. Biologia Molecular: Uma ferramenta para a Entomologia Forense.	5
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo Geral.....	8
2.2. Objetivos Específicos	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Área de Estudo e Coleta dos Organismos.....	9
3.2. Triagem e Identificação do Material.....	11
3.3. Extração do DNA e Material Testemunho	11
3.4. Quantificação e Amplificação do DNA (Reação em Cadeia de Polimerase).....	12
3.5. Eletroforese, Purificação e Sequenciamento.....	13
3.6. Alinhamento e Análise dos Dados.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Extração, Amplificação, Purificação e Sequenciamento das amostras	17
4.2. Filogramas – Análise de Neighbor-Joining (NJ)	20
4.3. Análise de Máxima Parcimônia (MP)	28
4.4. Máxima Verossimilhança (ML) e Distâncias Pareadas (Pairwise Differences).....	34
5. CONCLUSÃO.....	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
7. ANEXOS.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento das amostras analisadas.....	13
Tabela 2. Relação das espécies e respectivos exemplares sequenciados: Local e data da coleta, espécie e código do exemplar, concentração e pureza total dos nucleotídeos.....	Anexo - 54
Tabela 3. Índice de frequências de bases nitrogenadas (ACTG) e frequência de A+T e C+G.....	20
Tabela 4. Matriz de distâncias nucleotídicas das regiões do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) e o Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2) em conjunto para cada amostra objeto do presente estudo.....	24

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem de satélite do Campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná e Reserva Mata Viva onde foram realizados os experimentos.....10
- Figura 2.** Armadilha de Shannon modificada com carcaças de coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) em seu interior, protegidas por gaiola de metal.....10
- Figura 3.** Estrutura de metal e madeira com armadilha de Shannon modificada em seu interior utilizada no experimento com carcaça de suíno (*Sus scrofa*).....11
- Figura 4.** Dípteros de interesse forense coletados em Curitiba-PR das famílias Calliphoridae e Muscidae.....18
- Figura 5.** Produtos da amplificação visualizados em gel de agarose pelo processo de eletroforese em amostras de (a) *Ophyra aenescens* – COI \pm 600 pares de bases, amostras OAE (1-10) (Tabela 2 – Anexo); (b) *Chrysomya megacephala* – ITS2 \pm 300 pares de bases, amostras CME (1-10) (Tabela 2 – Anexo).....19
- Figura 6.** Asas de *P. xanthogeneiates* 001 e *P. xanthogeneiates* 002 , evidenciando uma diferença morfológica na curvatura da veia M, largura da célula r_{2+3} e comprimento da veia A_1+CuA_221
- Figura 7.** Filograma consenso obtido por análise de neighbor-joining utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI).....25
- Figura 8.** Filograma consenso obtido por análise de neighbor-joining utilizando sequencias da região do Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2).....26
- Figura 9.** Filograma consenso obtido por análise de neighbor-joining, utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I + Segundo Espaçador Interno Transcrito (COI+ITS2).....27

Figura 10. Filograma consenso de 478 obtido por análise de máxima parcimônia, utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI). CI=0,58; RI=0,88.....	31
Figura 11. Filograma consenso de 527 obtido por análise de máxima parcimônia, utilizando sequencias da região do Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2). CI=0,50; RI=0,86.....	32
Figura 12. Filograma consenso de 387 obtido por análise de máxima parcimônia, utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I + Segundo Espaçador Interno Transcrito (COI+ITS2). CI=0,55; RI=0,85.....	33
Figura 13. Filograma consenso obtido por análise de máxima verossimilhança, utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI). Modelo de substituição nucleotídica = GTR+G; -lnL= 3850.0906.....	36
Figura 14. Filograma consenso obtido por análise de máxima verossimilhança, utilizando sequencias da região do Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2). Modelo de substituição nucleotídica = GTR+I+G; -lnL= 11372.8260.....	37
Figura 15. Filograma consenso obtido por análise de máxima verossimilhança, utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I + Segundo Espaçador Interno Transcrito (COI+ITS2). Modelo de substituição nucleotídica = HKY+G; -lnL= 4851.8759.....	38
Figura 16. Gráficos de distâncias pareadas e frequências nucleotídicas, utilizando a região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) entre as espécies de Calliphoridae e Muscidae objetos de estudo do presente trabalho.....	39
Figura 17. Gráficos de distâncias pareadas e frequências nucleotídicas, utilizando a região do Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2) entre as espécies de Calliphoridae e Muscidae objetos de estudo do presente trabalho.....	40

Figura 18. Gráficos de distâncias pareadas e frequências nucleotídicas, utilizando a região do Citocromo C Oxidase Subunidade I + Segundo Espaçador Interno Transcrito (COI+ITS2) entre as espécies de Calliphoridae e Muscidae objetos de estudo do presente trabalho.....	41
--	----

RESUMO

Na entomologia forense diversas espécies pertencentes às famílias Calliphoridae e Muscidae podem ser úteis principalmente na estimativa do intervalo pós-morte, embora para tanto seja fundamental a correta identificação das espécies. Ocasionalmente, muitas vezes os insetos associados encontrados na cena do crime podem estar representados somente por espécimes em estágios imaturos, pupários ou apenas fragmentos corporais, dificultando o processo de identificação. O uso de marcadores moleculares em estudos de diagnóstico espécie-específico tem constituído uma nova abordagem alternativa aos estudos tradicionalmente desenvolvidos utilizando caracteres morfológicos. Neste contexto, a hipótese de caracterização molecular foi trabalhada através de técnicas de amplificação e sequenciamento, utilizando as regiões do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) do DNA mitocondrial e o Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2) do DNA ribossômico. A metodologia utilizada nas análises moleculares se mostrou eficiente na identificação, separando as espécies em clados distintos, e mostrando ser uma metodologia rápida e eficaz na identificação das espécies de interesse forense. Somente os exemplares de *Paralucilia xanthogeneiates* se comportaram nas análises como pertencentes a espécies diferentes, e os exemplares de *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata* e *Lucilia eximia* ocorrendo em clados distintos e distantes indicando a necessidade de estudos mais detalhados com os dois gêneros. Apesar dos resultados se mostrarem satisfatórios, ainda são necessários estudos em outras localidades para que a mesma metodologia seja testada e se possível, aplicada nas práticas de entomologia forense dos órgãos federais e estaduais, auxiliando e agilizando a identificação dos organismos encontrados em locais de morte violenta.

Palavras-chave: Diptera; Entomologia forense; marcadores moleculares.

ABSTRACT

In forensic entomology a lot of species belonging to families Calliphoridae and Muscidae can be helpful in the estimation of post-mortem interval, making it crucial the correct identification of species. However, the associated insects found in a crime scene may be represented only by specimens in immature stages, puparium or only body fragments, become difficulty the process of identification. The use of molecular markers in studies of species-specific diagnosis has constituted an alternative new approach to studies traditionally developed using morphological characters. In this context, the hypothesis of molecular characterization has been worked through techniques of amplification and DNA sequences, using the regions of Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) of mitochondrial DNA and the Second Internal Transcribed Spacer (ITS2) of the ribosomal DNA. The methodology used in molecular analysis was efficient in the identification, separating the species in distinct clades, and showing to be a fast and efficient methodology in identifying the species of forensic interest. Only specimens of *Paralucilia xanthogeneiates* behaved in analyzes as belonging to different species, and the specimens of *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata* and *Lucilia eximia* occurred in distinct and distant clades which indicates the necessity of more detailed studies with this two genera. The results were satisfactory, further, more studies are necessary in other locations using the same methodology and if it possible, applied in practice of forensic entomology, helping and making more agile the identification of the organisms found in violent death locations.

Key-words: Diptera; Forensic entomology; molecular markers.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Entomologia Forense: Importância e aplicações em casos de morte violenta.

Os insetos possuem um relacionamento muito diversificado com os outros seres vivos, principalmente o ser humano, podendo vir a causar malefícios como a transmissão de agentes causadores de doenças, destruição de lavouras cultivadas ou benefícios como, por exemplo, a polinização e a atuação no processo de decomposição da matéria orgânica vegetal e animal (Smith, 1986; Oliveira-Costa, 2007).

Isto ocorre devido ao fato dos insetos perceberem os odores exalados pelos cadáveres muito antes dos seres humanos, em sua procura por fonte de alimento ou sítio de procriação e oviposição (Catts & Haskell, 1990; Oliveira-Costa, 2007). Devido a esse hábito necrófago, no âmbito da criminalística, esses animais podem ser considerados verdadeiras “testemunhas” de uma cena de crime, já que muitas vezes são os primeiros a chegarem no local ou onde a vítima está localizada, ocorrendo em todas as fases da decomposição e estações do ano, de acordo com a biologia de cada espécie (Gunn, 2009).

Por definição a entomologia forense é a ciência que aplica o estudo dos insetos e outros artrópodes, em associação a outros procedimentos criminalísticos, em investigações de âmbito cível e criminal (Byrd & Castner, 2010). Na medicina-legal o estudo dos insetos pode ser aplicado em investigações sobre tráfico de entorpecentes, maus tratos e morte violenta (Catts & Haskell, 1990). Em casos de morte violenta, o uso dos insetos em investigações pode prestar esclarecimentos quanto à identidade do morto, como a morte ocorreu, o lugar onde a morte ocorreu, a causa da morte, se foi natural, acidental ou criminal, e principalmente o intervalo pós-morte (IPM), denominado o intervalo de tempo entre a data da morte e a data em que o cadáver foi encontrado (Wolff *et al.*, 2001; Oliveira-costa, 2007).

O estudo da fauna de cadáveres constitui a aplicação forense mais importante da entomologia na medicina legal (Keh, 1985). O armazenamento de todo esse conhecimento, juntamente com a análise dos dados de estudos de decomposição e história de vida de insetos, que podem então ser chamados “indicadores forenses”, servem para incrementar a exatidão das estimativas do IPM, contribuindo também para a agilização do tempo requerido para análise nas perícias médico-legais (Goff *et al.*, 1988; Catts & Haskell, 1990).

O conhecimento da fauna local é crucial e bastante útil em investigações, pois os dados de outras regiões, que podem ter diferentes características ambientais, podem não fornecer um nível suficiente de acurácia e exatidão na identificação das espécies encontradas

no local inicial do estudo, havendo a necessidade de um maior banco de dados de espécies encontradas por região (Cainé *et al.*, 2009).

Ainda existem relativamente poucos estudos sobre entomologia forense no Brasil, e um levantamento de riqueza de espécies de insetos por área estudada muito pobre. A divulgação dessa ciência é outro fator que se deve levar em consideração, pois ela é quase inexistente no âmbito policial nacional. Em razão disso, dados entomológicos importantes são completamente ignorados e, conseqüentemente, revelações valiosas se perdem, como foi relatado em um caso descrito por Pujol-Luz *et al.* (2006) onde informações entomológicas quase foram perdidas devido a praticamente todo material presente na cena do crime ter sido ignorado durante o processamento dos cadáveres e do local.

Felizmente no meio acadêmico pode-se verificar, atualmente no Brasil, um interesse crescente na pesquisa em entomologia forense, contemplando aspectos biológicos, ecológicos e taxonômicos, que possuem como finalidade alterar esse quadro, dando uma maior precisão na estimativa do intervalo pós-morte entre outras aplicações. (Moura *et al.*, 1997; Thyssen, 2005).

1.2. Calliphoridae e Muscidae: Características gerais e importância na área forense.

Dentre os dípteros de importância na entomologia forense destacam-se as famílias Calliphoridae e Muscidae, que auxiliam nas investigações permitindo, por exemplo, a estimativa do IPM, a detecção de drogas e toxinas, além de contribuírem na natureza como decompositores dos cadáveres (Vianna *et al.*, 2004).

Calliphoridae possui como características principais o corpo de uma forma geral com um tamanho médio a grande, comumente de coloração azul, violeta, verde ou cobre, com reflexos metálicos, principalmente no tórax e abdome; arista plumosa com cerdas geralmente longas até o ápice; pós-escutelo ausente ou pouco desenvolvido; mero e anepímero com cerdas bem desenvolvidas; catepisterno geralmente com três cerdas; notopleura com duas cerdas e raramente com cerda acessória; mesonoto com ou sem faixas pretas longitudinais; veia M_{1+2} fortemente curvada para diante, distalmente, estreitando a célula apical R_{4+5} e caliptras torácicas bem desenvolvidas (Shewell, 1987).

Os califorídeos se distribuem em todas as regiões biogeográficas, com mais de 1.500 espécies descritas em 108 gêneros (Evenhuis *et al.*, 2010). As espécies que ocorrem na região Neotropical estão agrupadas em quatro subfamílias: Mesembrinellinae, Chrysomyinae,

Calliphorinae e Toxotarsinae, com cerca de 28 gêneros e 130 espécies descritas (Amorim *et al.*, 2002; Mello, 2003; Carvalho & Mello-Patiu, 2008).

Os gêneros *Chrysomya*, *Hemilucilia*, *Lucilia*, *Cochliomyia* e *Calliphora* são os de maior importância forense para a região Neotropical (Oliveira-costa, 2007), na qual Carvalho & Mello-Patiu (2008) apontaram a ocorrência de 17 espécies. É a família de maior importância na entomologia forense, segundo Smith (1986), com muitas espécies com grande potencial para indicadores forenses (Marinho *et al.*, 2006).

Os Muscidae são dípteros de tamanho variado, apresentam caliptras e aparelho bucal bem desenvolvido, podendo ser do tipo lambedor ou picador sugador. Asa com a veia M_{1+2} muito ou pouco encurvada em direção a veia R_{4+5} , delimitando uma célula com abertura na altura da margem da asa e antenas possuindo geralmente arista plumosa até a extremidade distal (Huckett & Vockeroth, 1987).

Muscidae ocorre em todas as regiões biogeográficas e as espécies estão agrupadas em sete subfamílias: Atherigoninae, Muscinae, Azeliinae, Cyrtoneurinae, Phaoniinae, Mydaeinae e Coenosiinae. Atualmente compreende cerca de 4.500 espécies descritas distribuídas em 173 gêneros e oito subfamílias (Carvalho *et al.*, 2005; Couri & Carvalho, 2005). São conhecidas 840 espécies agrupadas em 84 gêneros na região Neotropical, sendo que no Brasil 20 espécies são de importância forense (Carvalho, 2002; Carvalho & Mello-Patiu, 2008).

1.3. Os desafios da identificação nas espécies de interesse forense.

Para a correta aplicação do estudo dos insetos na criminalística, a identificação precisa dos insetos associados aos cadáveres, além de ser de extrema importância, é o primeiro passo a ser dado na investigação, como também o conhecimento sobre o ciclo de vida, características bionômicas e ecológicas das espécies (Marchenko, 2001; Amendt *et al.*, 2004; Cainé *et al.*, 2009).

A identificação precisa de insetos adultos não é tão simples como pode parecer. Muitas chaves taxonômicas baseadas nos caracteres morfológicos externos podem estar limitadas a apenas alguns poucos grupos, ou ainda, disponíveis em publicações antigas que são inacessíveis por falta de atualizações, como também podem basear-se em caracteres específicos, tais como a genitália masculina, na qual sua preparação para exame pode ser complicada para pessoas inexperientes, além do fato de serem difíceis de serem encontradas

em um número considerável, já que normalmente as fêmeas são muito mais frequentes nas carcaças do que os machos (Thyssen, 2007).

Insetos imaturos são um problema ainda maior em relação à sua identificação do que os adultos, especialmente nos primeiros instares, por conta das variações intra-específicas existentes e discretas diferenças morfológicas entre muitas espécies que não são muito evidentes nessa fase do desenvolvimento dos insetos (Cainé *et al.*, 2009). Em muitas espécies a identificação até espécie de imaturos de 1º instar é praticamente impraticável, a de 2º instar é ocasionalmente possível por especialistas muito bem treinados. A identificação só atinge um limiar de probabilidade maior nos estágios de 3º instar e pré-pupa, mas somente em espécimes no qual foram preservados adequadamente (Greenberg & Tantawi, 1993). A técnica mais utilizada até o momento para identificação nesses estágios é a microscopia eletrônica de varredura (Catts & Haskell, 1990).

Uma alternativa para esse problema estaria na criação das larvas até o estágio adulto, mas esse procedimento usualmente consome tempo que muitas vezes é crucial em uma investigação, além de não existir um procedimento ou técnica universal de criação devido a cada peculiaridade individual requerida por cada espécie. A inexistência de chaves conhecidas que incluam todos os estágios do desenvolvimento das espécies fazem com que uma identificação rápida e precisa seja naturalmente complicada, mesmo para taxonomistas bem treinados (Morris & Dadour, 2005; Thyssen *et al.*, 2005).

A coleta cuidadosa e a preservação dos insetos da cena do crime é outro fator crucial para o bom andamento das investigações. Uma acurada determinação dos espécimes até o nível específico somente pode ser realizada se os caracteres morfológicos estiverem intactos e muito bem preservados para o estudo (Catts & Haskell, 1990). Uma falha durante esse processo pode acarretar, no caso de uma identificação equivocada, um fator prejudicial em uma investigação, resultando em perda de evidências importantes para o entomologista forense e erros ou falhas nos resultados de processos judiciais (Benecke & Wells, 2000).

Contudo, mesmo seguindo todos os protocolos e procedimentos de coleta e preservação dos espécimes, a realidade das cenas de crime não é bem assim, já que muitas vezes os insetos encontrados no local podem estar representados somente por pupários vazios ou fragmentos como pernas, asas ou até mesmo exemplares esmagados, quebrados e com falta de caracteres importantes para a correta identificação (Malgorn & Coquoz, 1999).

Isso pode ocorrer em casos de movimentação ou alteração do local original onde estava o cadáver, condições ambientais adversas como chuva e ventos, entre outras situações como, por exemplo, a não existência de pessoas treinadas para a coleta do material

entomológico e processamento da cena do crime. Nessas condições a identificação do material coletado somente por caracteres morfológicos se torna inviável, tendo que ser complementada através de outras técnicas.

1.4. Biologia Molecular: Uma ferramenta para a Entomologia Forense.

O avanço das técnicas moleculares tem favorecido muito o estudo dos insetos, principalmente nas áreas da taxonomia e sistemática, filogenia e também em estudos de genética populacional. Esta “nova ordem alternativa” vem sendo possível atualmente devido ao avanço das pesquisas e estudos de muitos grupos de genes em diferentes regiões do genoma (Otranto & Stevens, 2002).

Na entomologia forense estão sendo utilizadas técnicas moleculares no mundo todo para identificação das espécies e auxiliar na estimativa do intervalo pós morte, como por exemplo, no isolamento, amplificação e caracterização do material genético humano encontrado no trato digestivo de artrópodes hematófagos e necrófagos. Estudos como estes podem fornecer importantes provas da associação entre as larvas e o possível corpo no qual elas habitavam e em casos de morte violenta onde há dúvidas se os imaturos encontrados realmente se alimentaram e se desenvolveram na vítima encontrada, podendo ainda determinar a identidade e o sexo da vítima além da presença de drogas e outras substâncias tóxicas, mesmo em corpos em estado avançado de decomposição (Benecke, 2004; Thyssen, 2007; Gunn, 2009).

O uso de marcadores moleculares em estudos de caracterização de variabilidade genética e diagnóstico espécie-específico para insetos constituem uma abordagem alternativa aos estudos tradicionalmente desenvolvidos utilizando somente caracteres morfológicos e etiológicos (Sperling *et al.*, 1994; Otranto & Stevens, 2002). Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, que pode distinguir entidades geneticamente diferentes (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998).

Em contrastes com caracteres morfológicos, os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica, geralmente são herdados co-dominantemente e podem ser utilizados tanto em indivíduos jovens como em adultos (Brammer, 2000). Tendo em vista essas novas tendências, foi desenvolvido o projeto *DNA Barcode - The Barcode Life Project*, que consiste em um sistema único e universal que tem como objetivo identificar todos os eucariontes, tendo como base uma região específica do DNA mitocondrial, um fragmento da extremidade

5' da Subunidade I do gene Citocromo C Oxidase – COI. Essa região possui um comprimento aproximado de 650 pares de bases, na maioria dos grupos, e é ladeada por seqüências conservadas, sendo, por isso, relativamente fácil de ser isolada e analisada. (Hebert & Gregory, 2005).

Os genes situados nas mitocôndrias, estruturas presentes em vasto número em praticamente todas as células, são fontes de informações muito úteis para diversos estudos moleculares (Holland & Parsons, 1999). Na maioria dos animais, os espermatozóides não contribuem para a cadeia de mitocôndrias durante a formação do zigoto, e, por conseguinte, as mitocôndrias limitam-se apenas à linhagem feminina, ou seja, sua origem é uniparental. Mas, devido as suas altas taxas de alterações durante o processo evolutivo, o DNA mitocondrial pode ser muito útil para apontar alterações que ocorreram a menos de 15 milhões de anos atrás, como por exemplo, a separação de gêneros e espécies (Moore, 2006).

O COI é o marcador molecular mais utilizado, devido a sua organização genômica simples e uniforme, à falta de recombinação e de taxas elevadas de substituições nucleotídicas, além da possibilidade de recuperação eficaz de informações gênicas de amostras em estados inadequados de preservação. Todos esses fatores favorecem o seu uso como marcador em investigações forenses (Zhang & Hewitt, 1997).

No entanto, a utilização de um gene mitocondrial também traz algumas desvantagens, como, por exemplo, não ser eficiente na identificação de híbridos, não apontar fluxo gênico levado pelo macho (por se tratar de herança uniparental), e, em alguns casos, pode não ter uma taxa evolutiva rápida o suficiente para fornecer resolução ao nível de espécie (Chen *et al.*, 2010).

Do mesmo modo que o DNA mitocondrial, no núcleo da célula o DNA nuclear também é dividido em pequenas unidades chamadas genes em que cada um ocupa uma região específica chamada "locus". A informação genética total dentro da célula é denominada genoma. Há cerca de 35 mil - 45 mil genes e, em média, cada um deles compreende cerca de 3000 nucleotídeos, embora haja uma grande variação de acordo com o gene estudado (Gunn, 2009).

Estes genes codificam proteínas que determinam, por exemplo, nos seres humanos, o tipo de cabelo e a cor dos olhos, as enzimas que digerem certos alimentos e todas as características hereditárias. Apesar dessa vasta rede de genes, apenas uma pequena parte do genoma codifica essas e outras características, e entre estas regiões codificantes existem longas e repetitivas regiões não-codificantes, que apesar de serem classificadas como "DNA lixo" apresentam variabilidade e um grande potencial para diferenciar espécies e até mesmo

detectar diferenças na sua sequência de nucleotídeos dentro da mesma espécie (Song, *et al.*, 2008a).

O DNA ribossômico (DNAr) tem sido apontado como sendo um alvo valioso para estudos de sistemática molecular tanto de organismos relacionados quanto de organismos distantes, devido a essa região ser muito conservada e estar presente em todos os eucariontes. Os genes ribossomais estão agrupados como unidades repetitivas e nos insetos apresentam de 100 a 1000 cópias por genoma. Cada unidade consiste de regiões transcritas, nas quais estão os genes para as subunidades 18S, 5,8S e 28S dos ribossomos, dois espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2, e um espaçador externo transcrito (ETS) ou espaço intergênico – IGS (Hillis & Dixon, 1991).

Cada unidade de DNAr evolui de forma sincronizada, não acumulando mutações e podendo assim ser tratada como um único gene (Coleman, 2003). Dessa forma variações dessa região dentro da mesma espécie são muito pequenas, existindo, no entanto, alterações suficientes que permitem diferenciar as espécies. Essa alta taxa evolutiva sincronizada possibilitou a utilização dos espaçadores internos como marcadores moleculares (Song, *et al.*, 2008a; Chen *et al.*, 2010).

A região ITS2, por exemplo, possui uma taxa de substituição nucleotídica mais rápida que a da região 18S, possibilitando realizar estudos de relações mais recentes (de 50 milhões de anos contra 100 milhões de anos da região 18S). Por possuir sub-regiões mais conservadas, ser geralmente menor que 1 Kilobase (Kb), 160-420 pares de base e ser facilmente utilizada para a elaboração de iniciadores, facilitando assim, a amplificação por técnicas de reação em cadeia polimerase (PCR), essa região é preferencialmente escolhida para estudos de diferenciação entre as espécies (Paskewitz *et al.*, 1993; Coleman, 2003; Wilkerson *et al.*, 2004), e com grande potencial para se tornar um “novo *DNA Barcode*” (Chen *et al.*, 2010).

Para a entomologia forense, a utilização dos marcadores moleculares pode ser de grande utilidade na identificação dos imaturos, pupários e fragmentos de insetos que, na maioria das vezes, não são levados em consideração devido ao seu valor taxonômico ser baixo ou praticamente nulo, e que, em alguns casos, poderiam ser os únicos vestígios encontrados em uma cena de crime utilizados como evidências para levar os verdadeiros culpados à justiça.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar as principais espécies de Calliphoridae e Muscidae de importância forense, por meio de análises moleculares, utilizando a região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI – DNA Barcode) do DNA mitocondrial e o Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2) do DNA ribossômico (DNAr).

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar a amplificação e sequenciamento das regiões COI do DNA mitocondrial e ITS2 do DNAr nuclear nas espécies de Calliphoridae e Muscidae utilizando iniciadores de sequências universais já calibrados e presentes na literatura para dípteros de interesse forense.
- Testar a eficácia das regiões citadas do DNA nuclear e mitocondrial para a identificação das espécies através das sequências obtidas utilizando análises separadas e combinadas dos nucleotídeos das duas regiões.
- Construir árvores (filogramas) tendo como base análises de Neighbor-Joining, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e indicar possíveis problemas taxonômicos entre as espécies de Calliphoridae e/ou Muscidae.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo e Coleta dos Organismos

Foram realizados dois experimentos na Reserva Mata Viva localizada no interior do campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná (Curitiba-PR) entre os meses de abril de 2009 a novembro de 2009 (Figura 1).

A Reserva Mata Viva é uma área reservada para fins de pesquisa e extensão da Universidade Federal do Paraná. A sua área total possui cerca de 55.000 m² distribuídos ao redor do campus Centro Politécnico da UFPR, com coordenadas aproximadas de 25° 26' S e 49° 14' W e cerca de 900 m de altitude sobre o nível do mar (Reginato *et al.*, 2008).

A vegetação é típica de Floresta Ombrófila Mista, um bioma predominante em território paranaense e que atualmente consta com somente 0,8% de sua cobertura original, com alguns estágios avançados de regeneração (Reginato *et al.*, 2008). O clima da região é do tipo subtropical úmido mesotérmico e classificado como Cfb na escala Köppen, não possuindo assim uma estação seca definida. As temperaturas médias anuais em meses quentes e frios são inferiores a 24 °C e 13 °C, respectivamente, com uma média anual de 16-17 °C, umidade relativa do ar de 85% e uma precipitação variando entre 1400 a 1600 mm anuais (IAPAR, 2010).

Para a realização dos experimentos e coleta dos espécimes foram utilizados como iscas duas carcaças de coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758) e uma carcaça de suíno (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758), ambos sacrificados (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná, Processos: 23075.063455/2009-12 e 23075.083831/2009-87) e protegidos de répteis, aves e mamíferos necrófagos por uma gaiola de metal envolta por uma armadilha do tipo Shannon modificada (Rafael, 2002). No experimento realizado com o suíno a armadilha de Shannon foi colocada no interior da gaiola devido ao seu maior tamanho (Figuras 2 e 3).

Foram realizadas coletas diariamente de forma ativa, com a utilização de vidros letais, contendo acetato de etila, de acordo com procedimentos propostos por Almeida *et al.* (1998), durante os meses de abril e maio de 2009 nas carcaças de coelho e de julho à novembro de 2009 na carcaça de porco.

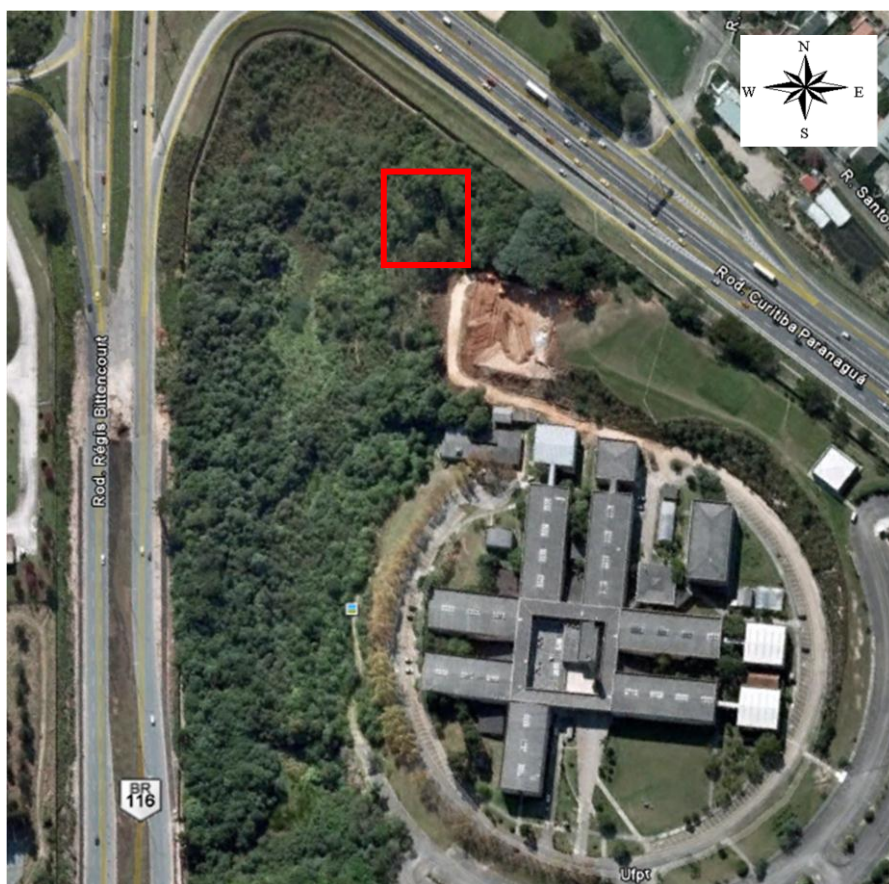


Figura 1 – Imagem de satélite do Campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, ao centro à direita inferior, e Reserva Mata Viva com local demarcado onde foram realizados os experimentos (Google Earth 5.1[®]).



Figura 2 – Armadilha de Shannon modificada com carcaças de coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) em seu interior, protegidas por gaiola de metal.



Figura 3 – Estrutura de metal e madeira com armadilha de Shannon modificada em seu interior utilizada no experimento com carcaça de suíno (*Sus scrofa*).

3.2. Triagem e Identificação do Material

Imediatamente, após cada coleta, foram realizadas triagens do material separando os dípteros por famílias tendo como base caracteres morfológicos como asas, coloração e quetotaxia. Feito isso, todos os exemplares das famílias Calliphoridae e Muscidae foram identificados até nível de espécie com a ajuda de um estereomicroscópio e chaves de identificação propostas por Dear (1985), Ribeiro & Carvalho (1998), Carvalho & Ribeiro (2000), Carvalho (2002), Cavalho *et al.* (2002a), Mello (2003), Marques & Couri (2007) e Carvalho & Mello-Patiu (2008).

Após a triagem e identificação do material, os espécimes foram acondicionados em microtubos de 1,5 ml contendo etanol na concentração de 96%, devidamente etiquetados e preservados em freezer a -20°C por aproximadamente seis meses.

3.3. Extração do DNA e Material Testemunho

A extração do DNA foi realizada utilizando o tórax inteiro de 5 a 10 indivíduos de cada espécie dos exemplares preservados. A cabeça, asas, pernas e abdômen dos espécimes foram acondicionados em microtubos de 1,5 ml contendo etanol a 96% com suas respectivas etiquetas contendo local coletado, data, nome do coletor, identificação e código da amostra (o

mesmo utilizado na identificação dos exemplares nos resultados do presente trabalho). Os espécimes foram depositados como material testemunho na Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná (Carvalho *et al.*, 2002b).

Cada amostra foi macerada com um pistilo em uma solução de 480 µl de Tris (MM 121,1g), SDS (MM 288,38g) e EDTA (MM 93,05g) todas a 50 mM de concentração; pH 8.0), adicionado 20 µl de solução de 20 mg/ml de Proteinase K e, em seguida incubadas por três horas em banho-maria a 55°C. Após foram adicionados 500 µl de EZDNA KIT de Extração (Biosystems®) e novamente submetidas a incubação por 12 horas à temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante passado para outro microtubo e lavado três vezes em etanol (95-100%) para a precipitação do DNA. Após a secagem em estufa, cada amostra foi ressuspensa em 70 µl de TE, composto por uma solução de 20 µl de Tris 10mM, 20 µl de EDTA 50 mM, 960 µl de H₂O ultrapura e preservado em freezer a -20°C.

3.4. Quantificação e Amplificação do DNA (Reação em Cadeia de Polimerase)

Foram utilizadas duas regiões distintas do DNA, nuclear ribossômico (DNAr) e mitocondrial (DNAm), dos organismos para a amplificação. No DNA mitocondrial, a região utilizada foi a porção final do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI), região que codifica o *DNA Barcode* (Hebert & Gregory, 2005). Para a amplificação dessa região, foram utilizados os iniciadores (primers) HCO2198-L (5'-TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3') e LCO1490-L (5'-GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG-3'), nomenclatura dos nucleotídeos de acordo com a IUPAC (2010), propostos por Nelson *et al.* (2007) representados na Tabela 1.

O processo foi realizado utilizando para cada amostra analisada 40 ng de DNA, calculado com base na concentração obtida em cada amostra, previamente medidas em um NanoDrop® 1000 - Thermo ScientificTM (Tabela 2 - Anexo), 0,4 µl de dNTP 25 mM, 0,5 µl de cada iniciador 25 mM, 2,5 µl de PCR buffer 100 mM, 1,5 µl de MgCl₂ 25mM, 0,3 µl de unidades de enzima Taq DNA Polimerase e 11,1 µl de H₂O ultrapura sendo adicionada uma parcela individual de H₂O ultrapura de acordo com a concentração de DNA a fim de completar o volume final de cada amostra (25 µl). Em seguida as amostras foram submetidas a um termociclador (Mastecycler® - Eppendorf), juntamente com uma amostra livre de DNA

(controle) para confirmar a ausência de contaminação nas amostras ou inibidores durante o processo de extração do DNA e preparação das reações de PCR.

Os parâmetros foram constituídos de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguidos por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 46°C por 30 segundos e alongamento a 72°C por 2 minutos, sendo o último ciclo seguido por um período de incubação de 5 minutos a 72°C com a finalidade completar o processo de quaisquer fitas que não foram completamente sintetizadas (Nelson *et al.*, 2007).

Para DNA nuclear ribossômico foi utilizado o Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2), os iniciadores utilizados para a amplificação dessa região foram ITS2_F2814–2835 (5'-TGCTTGGACTACATATGGTTGA-3') e ITS2_R3295–3317 (5'-GTAGTCCCATATGAGTTGAGGTT-3') propostos por Song *et al.* (2008a) – Tabela 1.

O procedimento e os reagentes utilizados, excetuando-se os iniciadores e a cadeia de ciclos, para amplificação da região ITS2 foram os mesmos usados para o COI. Os parâmetros para essa região foram de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto e alongamento a 72°C por 1 minuto, sendo novamente seguido por um período de incubação de 10 minutos a 72°C (Song *et al.*, 2008a).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento das amostras analisadas. Nomenclatura dos nucleotídeos de acordo com IUPAC (2010).

Iniciador	Posição	Região do DNA	Sequência	Autor
HCO-L	2198	COI - Mitocondrial	TAA ACT TCW GGR TGW CCA AAR AAT CA	Nelson <i>et al.</i> , 2007
LCO-L	1490	COI - Mitocondrial	GGT CWA CWA ATC ATA AAG ATA TTG G	Nelson <i>et al.</i> , 2007
ITS2_F	2814-2835	ITS2 - Nuclear	TGC TTG GAC TAC ATA TGG TTG A	Song <i>et al.</i> , 2008a
ITS2_R	3295-3317	ITS2 - Nuclear	GTA GTC CCATAT GAG TTG AGG TT	Song <i>et al.</i> , 2008a

3.1. Eletroforese, Purificação e Sequenciamento

Os produtos obtidos na reação de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% com adição de azul de bromofenol e sacarose (Blue Juice - corante auxiliador do carregamento das amostras no gel e visualização da frente de corrida) sendo, posteriormente, corados com brometo de etídeo e visualizados em câmara de luz ultravioleta. As amostras que obtiveram resultado positivo foram submetidas ao processo de purificação.

A purificação foi realizada seguindo um protocolo com base em polietilenoglicol (PEG 8000) 20% com adição de NaCl 2,5 mM, posteriormente os produtos foram armazenados em freezer a -20°C (LBGM, 2010).

As reações de sequenciamento foram realizadas com 40 ng de DNA amplificado por PCR, 1,6 µl de cada iniciador (adicionado separadamente por microtubo) e kit de sequenciamento ABIPRISM® Big Dye™ Terminator v.3.0. A amplificação das amostras para sequenciamento foi realizada em um termociclador (Mastecycler® - Eppendorf) com parâmetros de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, e 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos e alongamento a 60°C por 4 minutos (Nelson *et al.*, 2007).

Após este processo as amostras produtos da reação de sequenciamento foram submetidas a purificação em colunas de Sephadex (CentriSep Columns Princeton Separation) e levadas ao Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva da Universidade Federal do Paraná (LEMPE-UFPR) para secagem em SeepVap a 60°C por 45 minutos e sequenciamento no sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems®).

3.2. Alinhamento e Análise dos Dados

As sequencias obtidas separadamente, através de cada um dos iniciadores, foram analisadas pelo programa Pregap4 v.1.5 (Staden Package®) no qual foram sintetizadas as sequencias consenso (Staden *et al.*, 2010). Após, as sequências foram editadas visualmente para se obter uma maior confiabilidade de cada posição dos nucleotídeos nos eletroferogramas.

Realizada a verificação do posicionamento dos nucleotídeos, as similaridades das sequencias consenso obtidas com outras já presentes na literatura e suas respectivas posições taxonômicas foram testadas utilizando o algoritmo FASTA através do BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al.*, 1997; NCBI, 2010).

Os alinhamentos foram realizados através dos programas ClustalX 2.0.12 (Larkin *et al.*, 2007), utilizando *Multiple Alignment Mode* como parâmetro, e PRANK - *Probabilistic Multiple Alignment Kit* (Löytynoja & Goldman, 2005) com a finalidade de comparar os alinhamentos evitando regiões onde este apresentava muitas deleções ou intervalos (Gaps) nas sequências, e dar uma maior estimativa aos dados como proposto por Löytynoja & Goldman (2008), feito isso os alinhamentos obtidos foram submetidos ao programa Gblocks (Castresana, 2000; Talavera & Castresana, 2007) em seu próprio sítio na internet

(http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html), com os parâmetros *Allow Amaller Final Blocks*, *Allow Gap Positions Within The Final Blocks* e *Allow Less Strict Flanking Positions*, utilizados para preservar o máximo possível as sequencias originais.

O Gblocks é um programa que edita e exclui as regiões onde o alinhamento se mostra ambíguo, com resquícios de iniciadores e outras regiões do DNA que não interessam nas análises, além de evitar a edição manual das sequencias que podem estar sujeitas a interpretações subjetivas. Posteriormente os alinhamentos finais foram conferidos pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.0.9.0 (Hall, 1999).

Foram realizadas análises individuais de cada gene proposto no presente trabalho (COI e ITS2) e uma análise combinada entre os dois genes (COI+ITS2) utilizando as sequencias convergentes de ambos, com o propósito de fazer um estudo comparativo da eficácia da utilização das regiões em conjunto e separadas na identificação das espécies.

Análises de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) foram realizadas; criadas matrizes de distâncias evolutivas e árvores (filogramas) de distâncias entre os terminais através do programa MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis v.4 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando o modelo de análise de distâncias nucleotídicas *Jukes-Cantor* proposto por Jukes & Cantor (1969). O teste não paramétrico de Bootstrap (Felsenstein, 1985) para consistência dos ramos também foi realizado pelo programa MEGA v. 4 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando 1000 replicações.

As análises de Máxima Parcimônia (Carpenter, 1988) foram conduzidas através do programa MEGA v.4 (Tamura *et al.*, 2007) utilizando o método *Close-neighbor-interchange* proposto por Nei & Kumar (2000), selecionando o parâmetro *random addition* com 100 replicações, acrescido de um suporte de ramos por Bootstrap (Felsenstein, 1985) com 1000 replicações. Após a árvore de consenso (mais parcimoniosa) foi computada e enraizada de acordo com o terminal correspondente ao grupo externo.

Para as análises de Máxima Verossimilhança (Aldrich, 1997) foram escolhidos os modelos de evolução molecular (substituição nucleotídica) mais adequados de acordo com os alinhamentos pelo programa jModelTest (Posada, 2008). Após a determinação do modelo, as análises foram realizadas através do programa PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel, 2003) em seu servidor na internet (<http://atgc.lirmm.fr/phyml/>) com os parâmetros indicados pelo jModelTest (Posada, 2008) e MEGA v.5 (Kumar *et al.*, 2008), acrescido de um suporte de ramos por Bootstrap (Felsenstein, 1985) com 1000 replicações.

As árvores obtidas em todas as análises foram visualizadas e editadas pelos programas TreeView 1.6.6 (Page, 1996), Dendroscope (Huson *et al.*, 2007) e FigTree - *Tree Figure Drawing Tool* v. 1.3.1 (Rambaut, 2009).

Para uma maior visualização e compreensão das distâncias evolutivas que separam cada táxon, foram criados gráficos com cálculos de distâncias nucleotídicas (Pairwise Differences) entre os táxons através do programa DNA Sequence Polymorphism – DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2009) utilizando o modelo Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração, Amplificação, Purificação e Sequenciamento das amostras

Foram identificadas 12 espécies de dípteros pertencentes às duas famílias que foram objeto de estudo do presente trabalho. Em Calliphoridae foram identificadas *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1830), *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850), *Paralucilia xanthogeneiates* (Dear, 1850), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann, 1831) e *Calliphora lopesi* (Mello, 1962). Em Muscidae foram identificadas *Ophyra albuquerquei* (Lopes, 1985), *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830), *Psilochaeta pampiana* (Shannon & Del Ponte, 1926), *Graphomya podexaurea* (Enderlein, 1935) e *Synthesiomyia nudiseta* (Wulp, 1883) (Figura 4). Ainda foram incluídos no presente trabalho exemplares de *Lucilia eximia* provenientes das cidades de Ilha Grande – RJ e Botucatu – SP, *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) e *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) de Botucatu – SP e *Fannia pusio* (Wiedemann, 1830) proveniente de Curitiba – PR, na qual foi utilizada como grupo externo.

O DNA genômico total de 139 exemplares pertencentes a 15 espécies, foi extraído com sucesso. As concentrações e pureza dos nucleotídeos totais variaram de 2,1 a 658,7 ng/μl e 1,06 a 6,59 ηm, respectivamente, como mostra a Tabela 2 (Anexo). Essa grande diferença se deve, provavelmente, a degradação dos nucleotídeos de acordo com o tempo de armazenamento e também com o tamanho dos exemplares. Espécimes mais novos e com menor tempo de armazenamento tendem a ter uma maior taxa de concentração de nucleotídeos totais do que espécimes armazenados por um maior período de tempo, o mesmo acontecendo com exemplares de tamanho maior, onde a taxa de tecido utilizado no processo de extração também tende a ser maior, consequentemente resultando em uma concentração maior de ácidos nucléicos do que o que se obtém em espécimes de menor tamanho.

Foram amplificadas 114 amostras com sucesso da região COI (82%) e da região ITS2 foram obtidas com êxito 123 amostras amplificadas (88,4%) de 139 amostras no total. As amostras que obtiveram resultado satisfatório observados no processo de eletroforese (Figura 5) foram submetidas à purificação, as que não obtiveram sucesso foram descartadas.

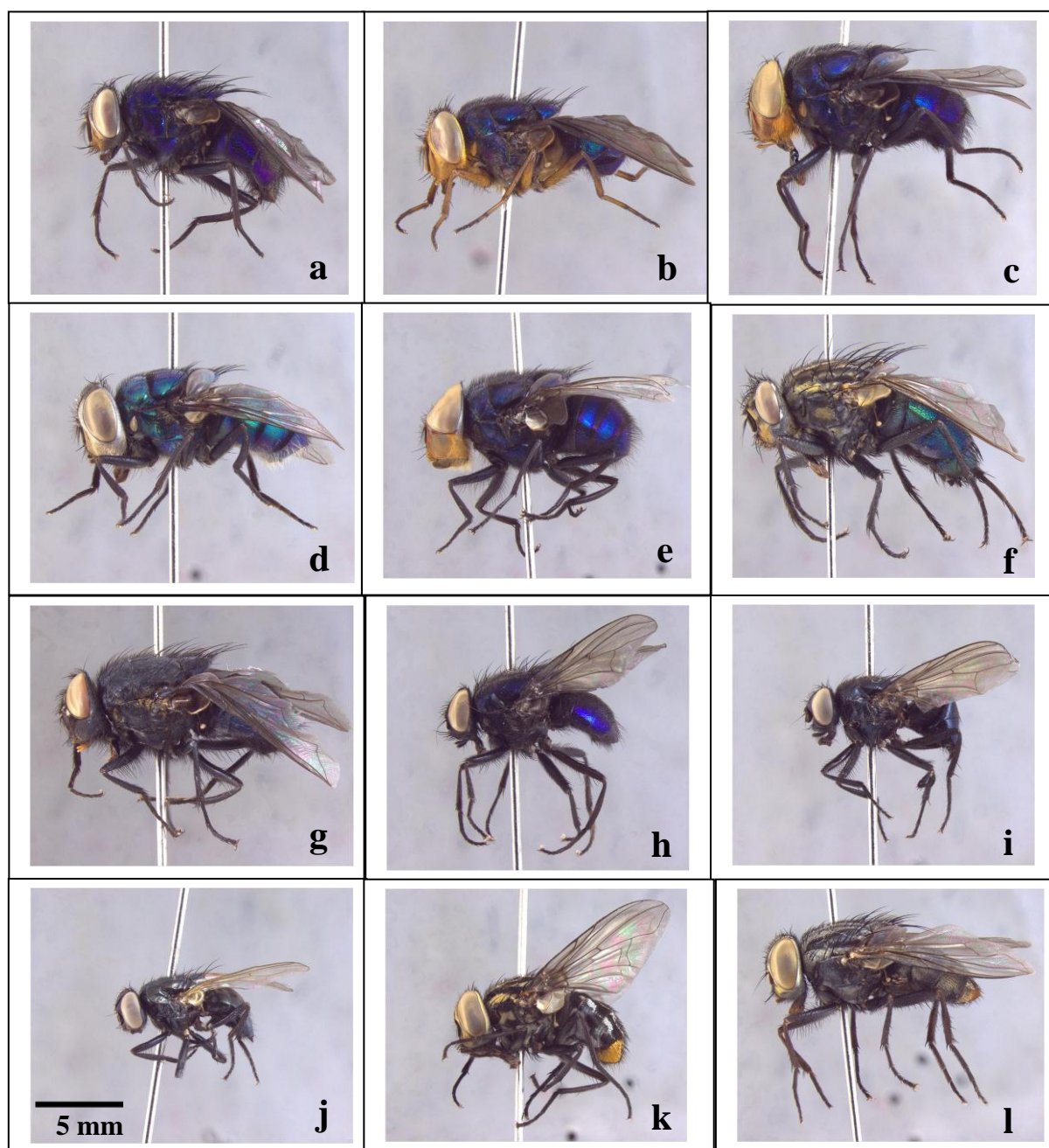


Figura 4 – Dípteros de interesse forense coletados em Curitiba-PR das famílias Calliphoridae: *Lucilia eximia* (a), *Hemilucilia semidiaphana* (b), *Paralucilia xanthogeneiates* (c), *Chrysomya albiceps* (d), *Chrysomya megacephala* (e), *Sarconesia chlorogaster* (f), *Calliphora lopesi* (g) e Muscidae: *Psilochaeta pampiana* (h), *Ophyra albuquerquei* (i), *Ophyra aenescens* (j), *Graphomya podexaurea* (k), *Synthesiomyia nudiseta* (l).

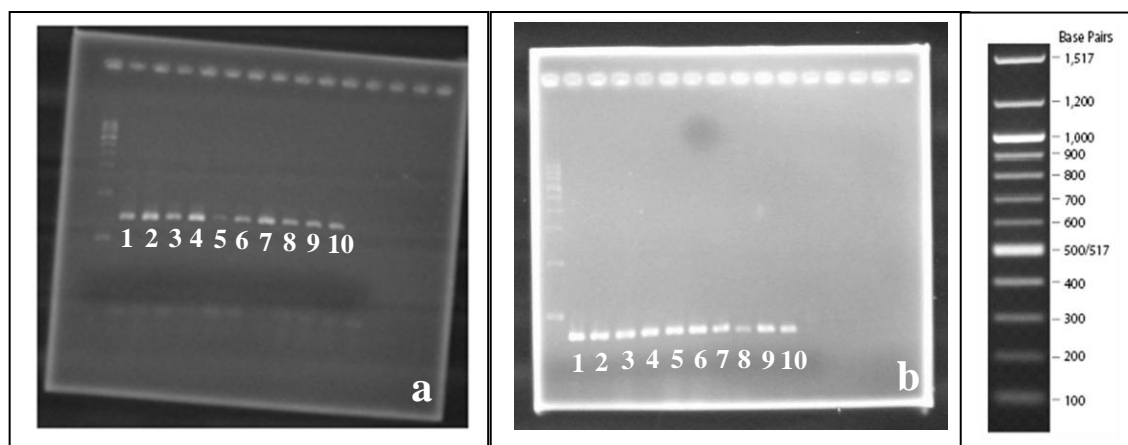


Figura 5 – Produtos da amplificação visualizados em gel de agarose pelo processo de eletroforese em amostras de (a) *Ophyra aenescens* – COI \pm 600 pares de bases, amostras OAE (1-10) (Tabela 2 – Anexo); (b) *Chrysomya megacephala* – ITS2 \pm 300 pares de bases, amostras CME (1-10) (Tabela 2 – Anexo).

Após o processo de seqüenciamento, foram obtidas 90 sequencias consenso da região COI variando de 570 a 620 pares de bases e 78 sequencias da região ITS2 com 350 a 420 pares de bases, ambas com picos bem estabelecidos observados nos eletroferogramas e de modo geral com pouca incidência de códons de parada (gaps) nas sequencias da região COI se comparadas com as da região ITS2, as sequencias que não atingiram esse limiar ou não apresentaram boa resolução nos eletroferogramas foram eliminadas e retiradas das análises. Após o alinhamento e submissão ao Gblocks, foi estabelecido um número de pares de bases de 390 para a região COI e 380 para a região ITS2, com a finalidade de uniformizar os dados.

Wilkerson *et al.*, (2004) em um estudo genético realizado com populações de *Anopheles crucians* (Diptera: Culicidae), observaram uma alta taxa de diferenciação intra-específica no número de pares de base das sequencias da região ITS2 e uma alta variabilidade intragenômica nas sequencias de diferentes indivíduos da mesma espécie, apresentando um número maior de códons de parada, fato que pode ser explicado devido a região possuir uma taxa nuclear evolutiva mais elevada em relação a outras regiões do DNA como por exemplo o COI.

Os índices de frequências de bases podem ser observados na Tabela 3, sendo evidenciado que os maiores índices observados são do conjunto A+T, 64,68% na região COI, 71,83% na região ITS2 e 69,27% na combinação dos dois genes, corroborando com resultados obtidos por Wallman & Donnellan (2001) de 69,1% de A+T para genes mitocondriais em um estudo de identificação molecular de Calliphoridae de interesse forense na Austrália e de 81,1% para *Lucilia ampullacea* (Calliphoridae) e 76,5% para Muscidae na

região ITS2 em um trabalho de evolução molecular em Calyptratae realizado por Song *et al.* (2008b) no sudeste da China.

Tabela 3. Índice de frequências de bases nitrogenadas (ACTG) e frequência de A+T e C+G. Nomenclatura dos nucleotídeos de acordo com IUPAC (2010).						
Região (Gene)	A	C	T	G	A+T	C+G
COI	0,3676	0,1718	0,2792	0,1814	0,6468	0,3532
ITS2	0,3762	0,1392	0,3421	0,1425	0,7183	0,2817
COI+ITS2	0,4040	0,1201	0,2887	0,1872	0,6927	0,3073

4.2. Filogramas – Análise de Neighbor-Joining (NJ)

As análises de neighbor-joining foram realizadas com a finalidade de estimar as relações evolutivas entre as espécies e suas respectivas distâncias, ou tempo de divergência entre os clados, tendo como objetivo principal somente a separação das espécies em clados monofiléticos, já que esse tipo de análise, como também o projeto DNA *Barcode* não possui a finalidade de estabelecer relações filogenéticas entre as espécies (Saitou & Nei, 1987; Nelson *et al.*, 2007).

Foram incluídos 90 terminais, respectivos às sequências dos espécimes obtidos, da região do Citocromo C Subunidade I (COI), 78 terminais do Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2) e 56 terminais das sequências combinadas entre os dois genes. A análise dos dados gerou uma matriz de distâncias evolutivas para cada gene e uma para os dois genes em conjunto (Tabela 4).

Foram obtidos três filogramas representados nas Figuras 7, 8 e 9, acrescidos de valores referentes ao suporte de ramos por bootstrap (Felsenstein, 1985). Na Figura 7 a análise das sequências do COI mostrou resultados satisfatórios na separação das espécies em clados monofiléticos, com um suporte de ramos bem elevado, variando de 97 a 99% nos ramos terminais, com exceção do clado formado por *Lucilia cuprina* que obteve um suporte de 84% e pelos clados representados por *Paralucilia xanthogeneiates* que se comportaram como sendo indivíduos de duas espécies diferentes.

O gênero *Paralucilia* foi descrito por Brauer e Bergenstamm em 1891, juntamente com o gênero *Myiolucilia* (Hall, 1948) para abrigar espécies que não possuíam uma identificação bem definida como, por exemplo, *Calliphora fulvipes*. O gênero é composto no

Novo Mundo por três espécies descritas, *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877), *Paralucilia xanthogeneiates* (Dear, 1985) e *Paralucilia adespota* (Dear, 1985).

Carvalho & Mello-Patiu (2008), juntamente com muitos autores da atualidade (Dear, 1985), relataram que o gênero necessita de revisão. As análises moleculares do COI colocam os terminais representados por *Paralucilia xanthogeneiates* em dois clados distintos. Contudo devido às análises de neighbor-joining não possuírem sinal filogenético relevante e ao pequeno número de amostragem especificamente destes terminais do presente trabalho, se fazem necessários outros estudos mais detalhados para resolução dos problemas taxonômicos do gênero.

Uma análise morfológica das asas de dois exemplares (material testemunho) presentes nas análises moleculares foi realizada, através de montagem em lâminas, e confirmada uma diferença na curvatura da veia M, na largura da célula r_{2+3} e no comprimento da veia A_1+CuA_2 nos exemplares *P. xanthogeneiates* 001 e *P. xanthogeneiates* 002, que pode ser observada na Figura 6.

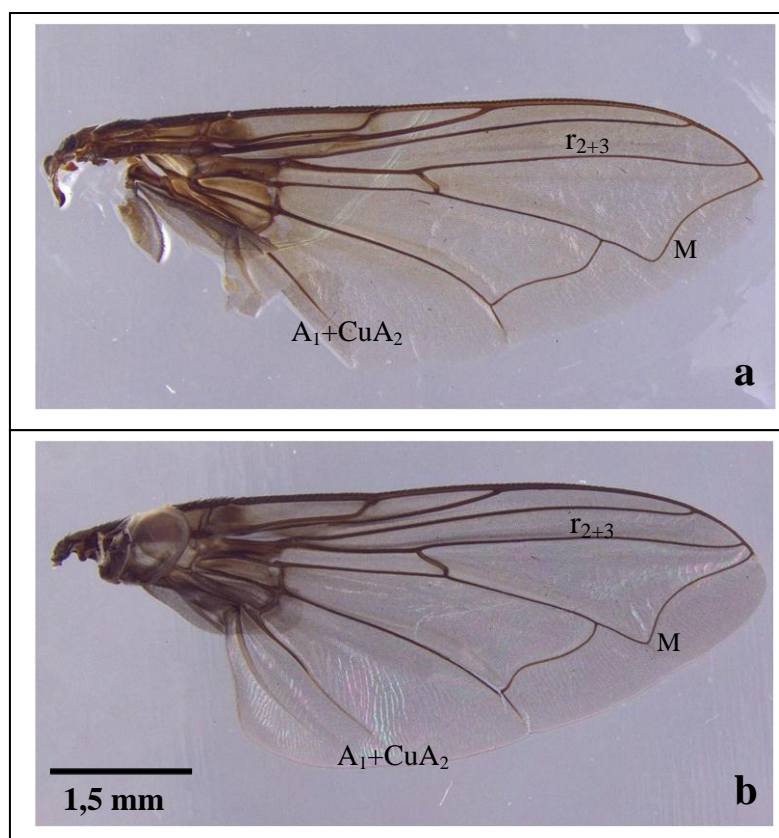


Figura 6 – Asas de *P. xanthogeneiates* 001 (a) e *P. xanthogeneiates* 002 (b), evidenciando uma diferença morfológica na curvatura da veia M, largura da célula r_{2+3} e comprimento da veia A_1+CuA_2 .

O filograma obtido a partir da análise do ITS2 (Figura 8) obteve resultados um pouco distintos da análise com o COI, mas igualmente satisfatórios no estabelecimento de clados monofiléticos diferenciando as espécies, com exceção do clado formado por *Ophyra anescens* no qual não ficou muito bem estabelecida a separação com *Ophyra albuquerquei* em clados distintos, e apresentando um suporte de ramos relativamente baixo (55%).

Com exceção de *Ophyra anescens*, os terminais correspondentes à Muscidae obtiveram um suporte de ramos de 100% nos clados mais internos, já nos terminais referentes à Calliphoridae o suporte obteve uma variação de 68 a 100% na análise, principalmente nas espécies *Lucilia eximia* e *Calliphora lopesi* que obtiveram uma grande variação intra-específica em suas respectivas sequências nucleotídicas.

Matsumoto *et al.* (2009) publicaram resultados semelhantes em um trabalho realizado com o objetivo de diferenciar 25 espécies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) utilizando as regiões ITS1 e ITS2 no Japão, em que ambas as regiões apresentaram uma alta taxa de variabilidade entre as espécies.

Os clados referentes à *Paralucilia xanthogeneiates* também se comportaram como duas espécies distintas na análise com o ITS2, da mesma forma como ocorreu na análise do COI, apenas com a diferença da exclusão do exemplar *P. xanthogeneiates* 004 devido a sua sequência não apresentar boa resolução e não podendo assim ser uniformizada com os padrões estabelecidos na metodologia para as análises.

A análise combinada entre os dois genes (COI+ITS2) apresentou um filograma com dados mais consistentes do que as análises com os genes separados (Figura 9). Pode ser observada a separação dos terminais em clados monofiléticos, alguns apresentados como politomia, e com um suporte de ramos de 99 a 100%, excetuando somente o clado formado por *Lucilia sericata* e *Lucilia cuprina* que obteve um valor de 93%, mas ainda assim elevado.

Os clados representados por *Paralucilia xanthogeneiates* novamente se comportaram ocorrendo em regiões distintas na análise combinada, confirmando a hipótese de se tratar de duas espécies diferentes como observado nas análises separadas dos dois genes.

Nelson *et al.* (2007) realizaram um estudo de identificação molecular utilizando as regiões COI e ITS2 separadas em nove espécies do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) na costa leste da Austrália; obtiveram resultados satisfatórios na separação das espécies utilizando o COI e a região ITS2 proveu apenas informações extras nos casos de espécies que apresentavam identificação duvidosa. Os mesmos autores (Nelson *et al.*, 2008) em um trabalho de identificação molecular das mesmas nove espécies de *Chrysomya* utilizando análises combinadas entre a região ITS2 e genes mitocondriais observaram que a

região ITS2 sozinha não é muito adequada para resolução de problemas taxonômicos e estabelecer relações entre as espécies do gênero, contudo a análise combinada com genes mitocondriais se mostrou mais satisfatória e com dados mais consistentes na separação das espécies.

Em todos os filogramas houve a correta separação do grupo externo representado por *Fannia pusio*, e as espécies pertencentes ao gênero *Lucilia* não foram agrupadas em clados monofiléticos, o que sugere a necessidade de estudos moleculares mais detalhados, com uma maior amostragem e um maior número de regiões sequenciadas a ser realizado no gênero.

Tabela 4 – Matriz de distâncias nucleotídicas das regiões do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) e o Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2) em conjunto para cada amostra objeto do presente estudo.

[illegible]

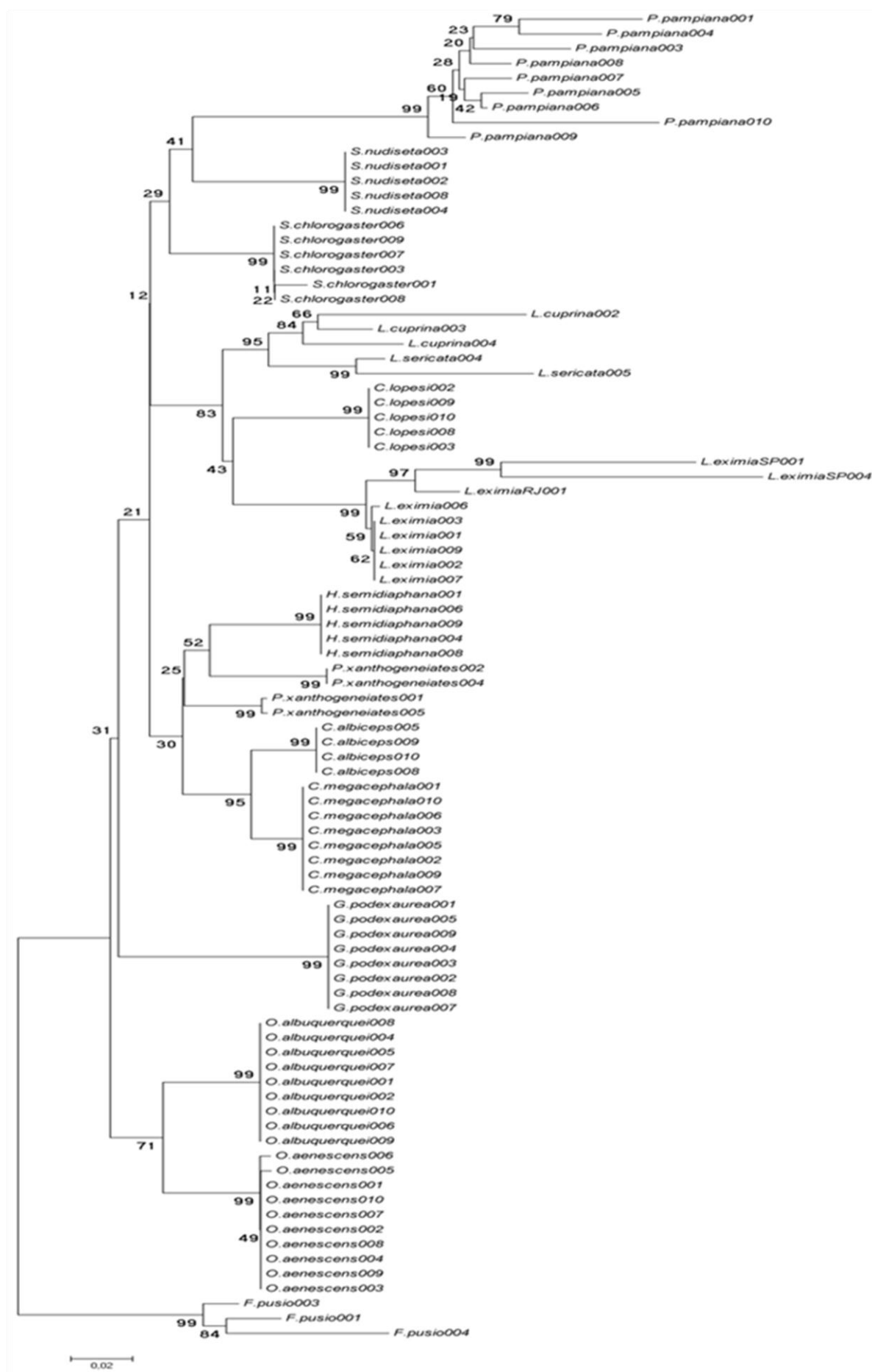


Figura 7 – Filograma consenso obtido por análise de neighbor-joining, utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI). Valores dos ramos correspondem ao suporte por bootstrap (1000 replicações). Cada terminal corresponde a um indivíduo.

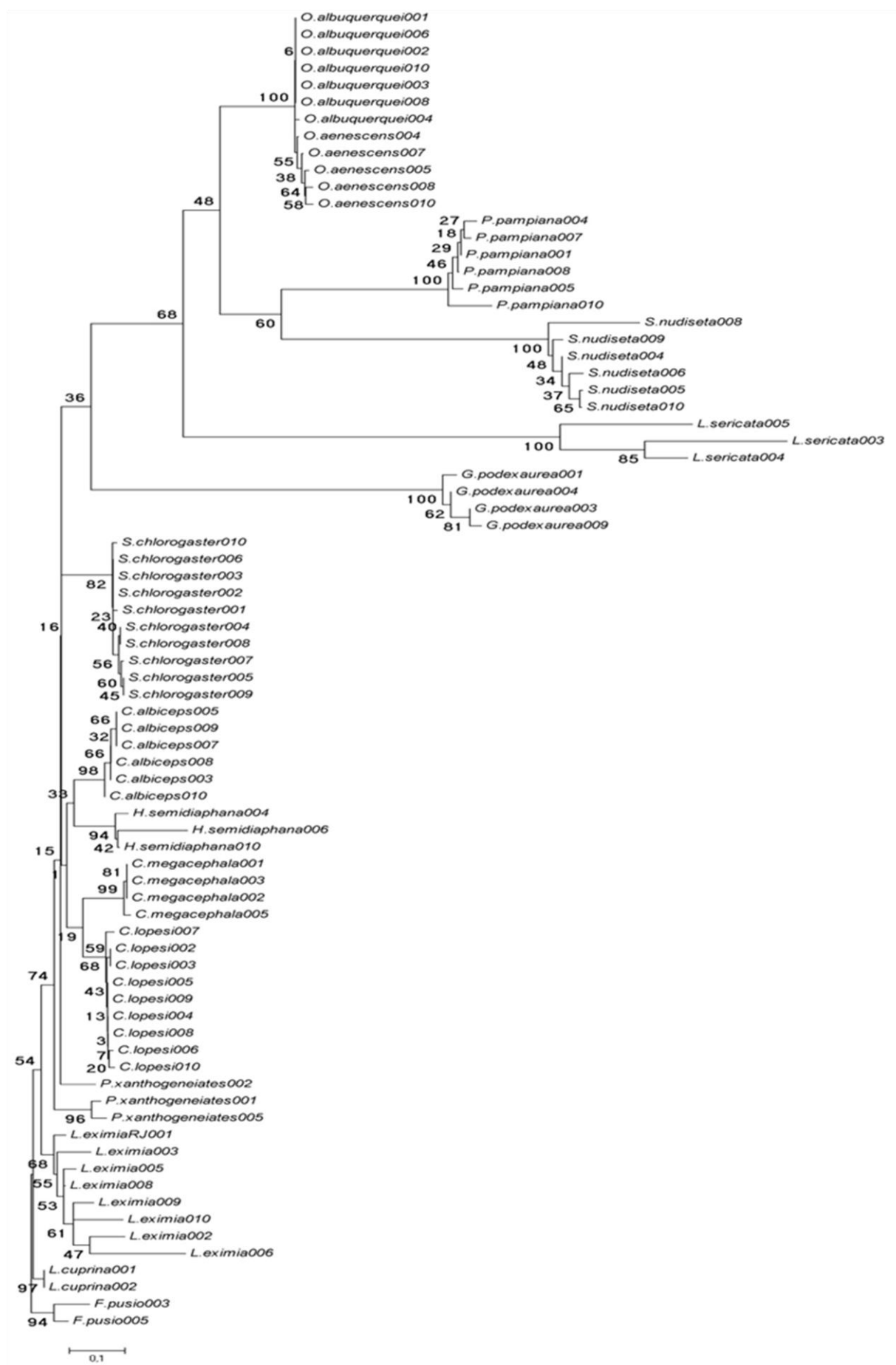


Figura 8 – Filograma consenso obtido por análise de neighbor-joining, utilizando sequencias da região do Segundo Espaador Interno Transcrito (ITS2). Valores dos ramos correspondem ao suporte por bootstrap (1000 replicações). Cada terminal corresponde a um indivíduo.

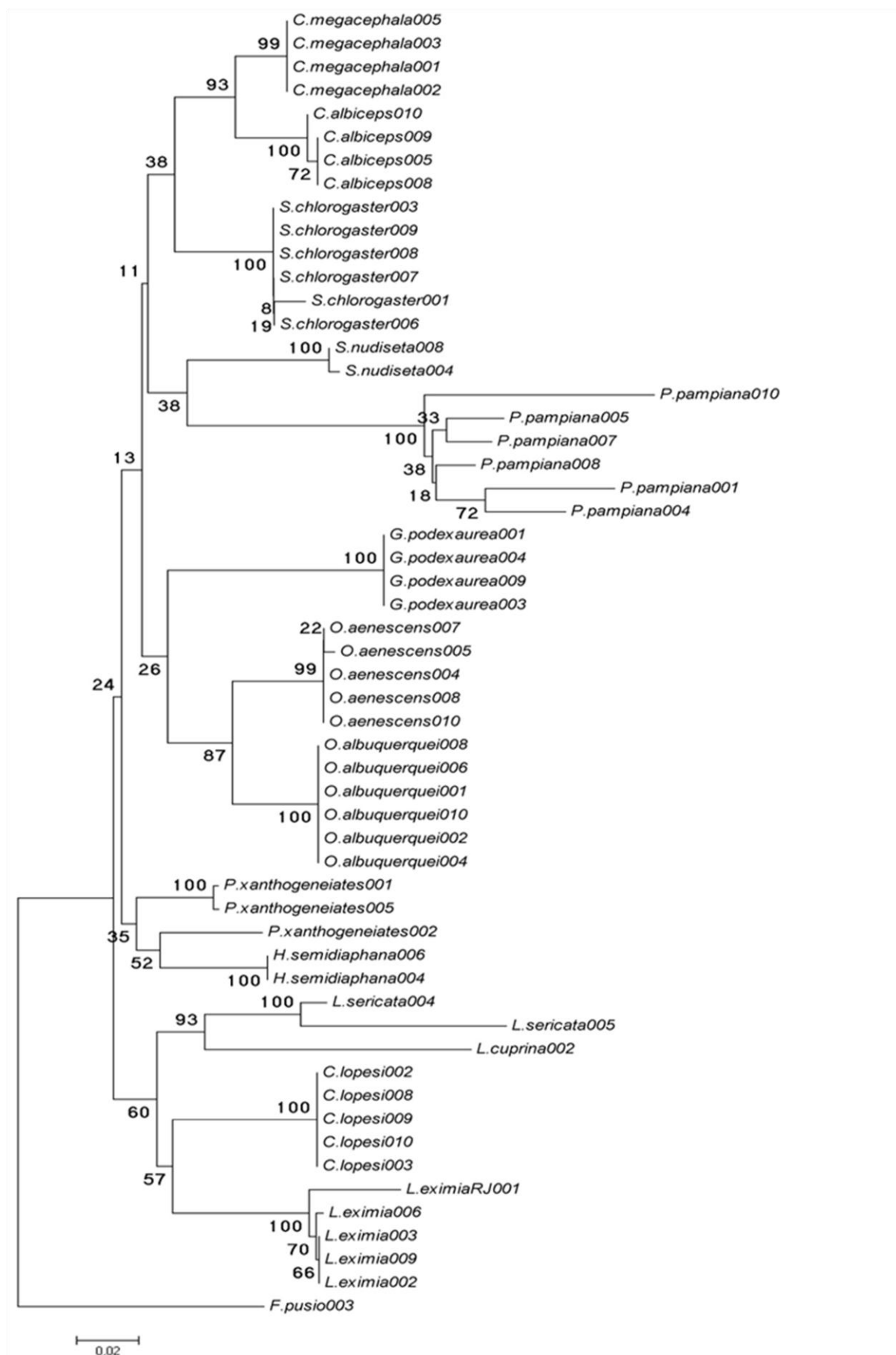


Figura 9 – Filograma consenso obtido por análise de neighbor-joining, utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I + Segundo Espaador Interno Transcrito (COI+ITS2). Valores dos ramos correspondem ao suporte por bootstrap (1000 replicações). Cada terminal corresponde a um indivíduo.

4.3. Análise de Máxima Parcimônia (MP)

A análise de máxima parcimônia das 90 sequências do COI resultou em 478 árvores (filogramas) apresentando uma taxa de substituição nucleotídica em 298 posições. O filograma mais parcimonioso apresentou um índice de consistência (CI) de 0,58 e um índice de retenção (RI) de 0,88 (Figura 10). Os valores do índice de bootstrap para o suporte dos ramos se mostraram bem elevados nos ramos terminais, variando de 88 a 100%.

Os valores resultantes dos índices de consistência e de retenção obtidos na análise sugerem a presença de caracteres homoplásicos (homoplasias nucleotídicas) e caracteres autapomórficos (exclusivos de determinado táxon), respectivamente, que pode ser explicado devido às várias politomias geradas no filograma, agrupando os táxons terminais pertencentes à mesma espécie.

Os resultados obtidos na análise de máxima parcimônia se comparados à análise de neighbor-joining se mostraram semelhantes e satisfatórios na separação dos táxons terminais de espécie, excetuando-se apenas os clados formados por *Paralucilia xanthogeneiates* igualmente ao ocorrido na análise de neighbor-joining. O mesmo ocorrendo com as espécies do gênero *Lucilia* que também se comportaram na análise pertencentes à clados diferentes.

Na análise de máxima parcimônia com caracteres moleculares pode se observar os exemplares das duas espécies em clados distintos, apresentando um suporte de ramos bastante elevado, sendo a região COI efetiva na separação dessas duas espécies.

Wells & Willians (2007) em um trabalho de identificação molecular de espécies de Chrysomyinae nos Estados Unidos e Canadá, conseguiram a separação de todas as espécies em clados diferentes em uma análise de máxima parcimônia, mesmo trabalhando com espécies possuindo caracteres morfológicos muito próximos e utilizando somente a região COI do DNA mitocondrial.

Os exemplares de *Lucilia eximia* provenientes de Botucatu – SP e Ilha grande – RJ, se comportaram nas análises como pertencentes a um clado separado e com um maior comprimento dos ramos entre os demais exemplares coletados em Curitiba – PR. A ocorrência deste fato deve-se provavelmente a uma variação na sequência de nucleotídeos dentro da mesma espécie nas diferentes populações, o que reforça ainda mais a necessidade de estudos mais detalhados a serem realizados com as espécies do gênero.

Kosmann (2009) constatou uma variação na sequência de nucleotídeos em exemplares de *Lucilia eximia*, utilizando a região COI em suas análises, de diferentes localidades, nas quais foram reconhecidas três unidades biológicas diferentes que guardavam o mesmo nome,

comprovando assim a não monofilia da espécie e necessidade de maiores estudos morfológicos, moleculares e biogeográficos. As espécies do gênero *Lucilia* possuem uma importância forense elevada em estudos de casos no Brasil e para que essas espécies possam ser devidamente aplicadas como indicadoras forenses, sua taxonomia deve estar bem resolvida para que sejam evitados possíveis erros ou falhas no processo de identificação dos organismos encontrados em locais de morte violenta.

Uma análise filogenética com espécies do gênero *Lucilia* coletadas de diversas localidades e utilizando a região COI foi realizada por Wells *et al.* (2007). A árvore consenso de máxima parcimônia obtida resultou em clados representados por diferentes exemplares de espécies iguais, mas em posições diferentes no cladograma, o mesmo ocorrido no trabalho de Kosmann (2009), e reforçando ainda mais a hipótese parafilética do gênero e a necessidade de maiores estudos, tantos morfológicos quando moleculares.

Com exceção do clado formado por *Sarconesia chlorogaster*, a análise de máxima parcimônia apresentou um resultado mais consistente na separação de Calliphoridae e Muscidae em clados distintos, como também a separação do grupo externo formado por *Fannia pusio*.

A análise com as 78 sequências da região ITS2 resultou em 527 filogramas com uma taxa de substituição nucleotídica de 119 posições. O filograma mais parcimonioso, representado na Figura 11, apresentou um índice de consistência de 0,50 e um índice de retenção de 0,86. O índice de bootstrap gerou valores variando de 82 a 99%, excetuando os clados formados por *Lucilia eximia* e *Lucilia sericata* que obtiveram um índice de 40 e 66%, respectivamente, para o suporte de ramos.

A região ITS2 apresentou resultados satisfatórios na separação dos táxons terminais da maioria das espécies na análise de máxima parcimônia, apresentando índices de bootstrap em sua maioria elevados. Pode ser observado no filograma mais parcimonioso a separação dos terminais referentes à Muscidae em um clado distinto dos táxons terminais de Calliphoridae, com exceção de *L. sericata* e do grupo externo formado por *F. pusio* (Fanniidae).

Não foi totalmente resolvida na análise a separação do clado formado por *Ophyra albuquerquei* e *Ophyra aenescens*, igualmente ao ocorrido na análise de neighbor-joining, mostrando mais uma vez que a região ITS2 sozinha não é muito eficaz na diferenciação dessas duas espécies.

Os clados referentes à *P. xanthogeneiates* se comportaram como sendo duas espécies distintas nessa análise, como também as espécies do gênero *Lucilia* que resultaram em clados diferentes e com comprimento de ramos variados principalmente em *L. eximia*.

O resultado da análise combinada entre as regiões COI e ITS2 gerou 387 filogramas apresentando uma taxa de substituição nucleotídica em 310 posições. A árvore mais parcimoniosa (Figura 12) apresentou um índice de consistência de 0,55 e um índice de retenção de 0,85. Os valores de bootstrap obtiveram uma variação de 97 a 100%, os maiores valores se comparados com as análises das duas regiões separadas.

O filograma obtido pela análise combinada foi o que obteve dados mais consistentes nas análises de máxima parcimônia, apresentando suporte de ramos nos clados mais internos com valores mais elevados e maior eficácia na separação das espécies.

Wells & Sperling (2001) em um trabalho de identificação molecular de espécies de Chrysomyinae (Calliphoridae) realizado nos Estados Unidos utilizando genes mitocondriais e nucleares, obtiveram na análise de máxima parcimônia a separação eficaz de todas as espécies trabalhadas, inclusive espécies consideradas muito próximas como *Chrysomya albiceps* e *C. rufifacies*.

As análises de máxima parcimônia se mostraram de um modo geral consistentes na separação dos terminais em grupos de espécie, todas obtendo valores de índices de consistência e índices de retenção satisfatórios, no entanto a análise combinada dos dois genes se mostrou mais consistente na separação de todas as espécies e com suporte de ramos mais elevados, como ocorreu na análise de neighbor-joining.



Figura 10 – Filograma consenso de 478 obtido por análise de máxima parcimônia, utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI). CI=0,58; RI=0,88. Índices correspondem ao filograma mais parcimonioso e valores dos ramos correspondem ao suporte por bootstrap (1000 replicações). Cada terminal corresponde a um indivíduo.

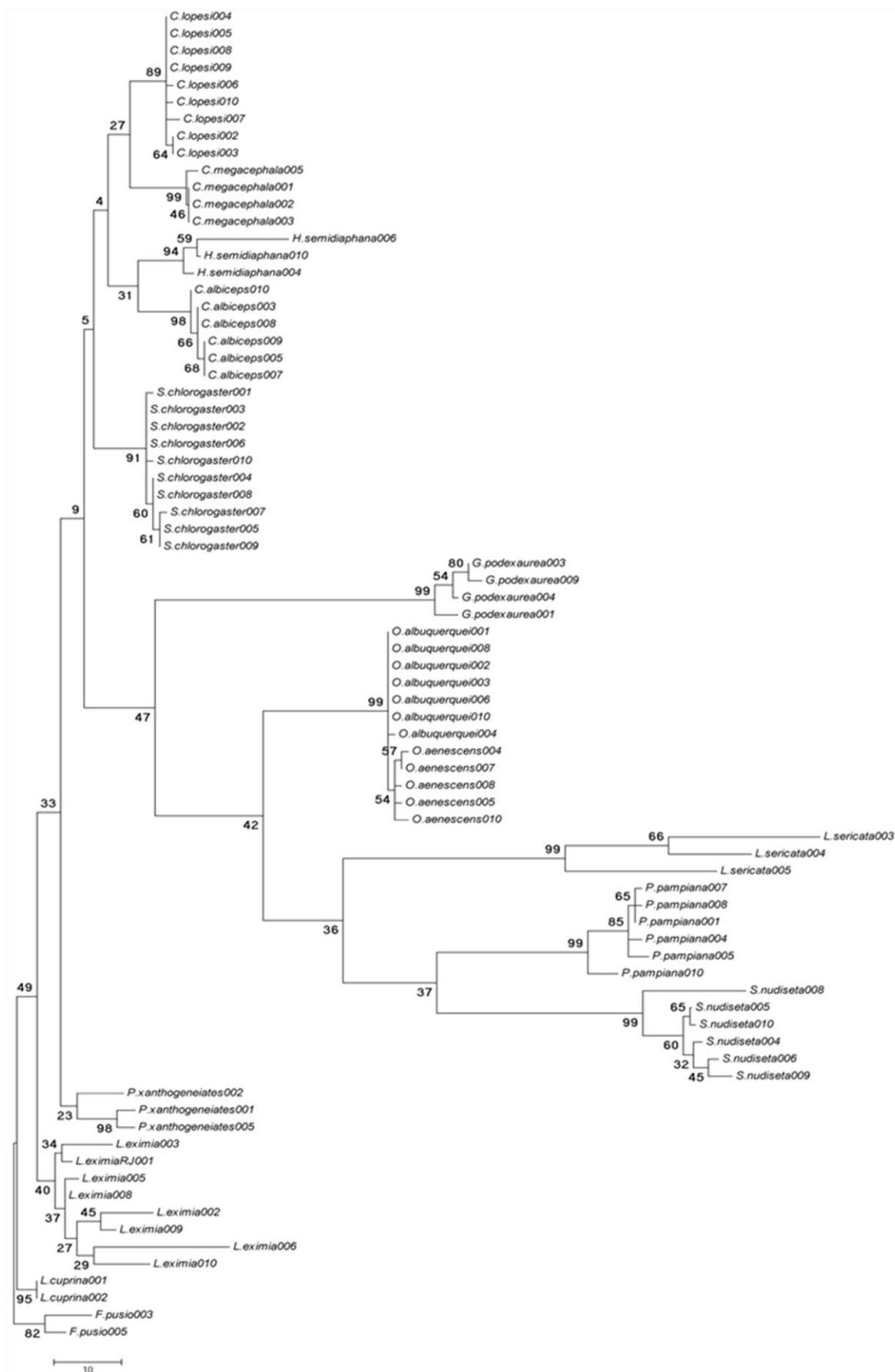


Figura 11 – Filograma consenso de 527 obtido por análise de máxima parcimônia, utilizando sequencias da região do Segundo Espaador Interno Transcrito (ITS2). CI=0,50; RI=0,86. Índices correspondem ao filograma mais parcimonioso e valores dos ramos correspondem ao suporte por bootstrap (1000 replicações). Cada terminal corresponde a um indivíduo.

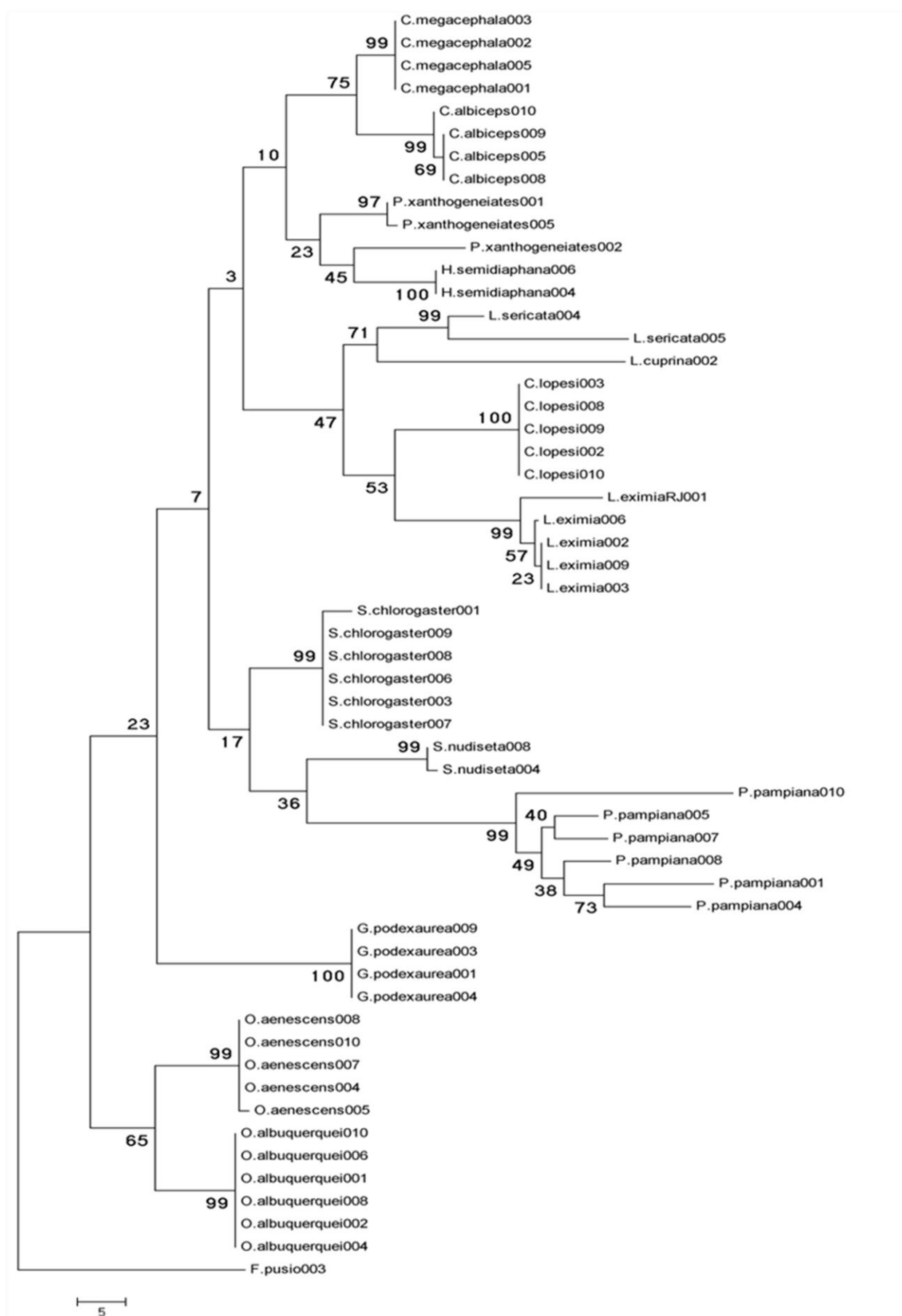


Figura 12 – Filograma consenso de 387 obtido por análise de máxima parcimônia, utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I + Segundo Espaçador Interno Transcrito (COI+ITS2). CI=0,55; RI=0,85. Índices correspondem ao filograma mais parcimonioso e valores dos ramos correspondem ao suporte por bootstrap (1000 replicações). Cada terminal corresponde a um indivíduo.

4.4. Máxima Verossimilhança (ML) e Distâncias Pareadas (Pairwise Differences)

A análise de máxima verossimilhança utilizando a região do Citocromo C Oxidase Subunidade I resultou no filograma consenso observado na Figura 13. O programa jModelTest v.0.1.1 indicou o modelo GTR+G (*General Time Reversible + Gamma distribution*) escolhido através do método *Akaike Information Criterion* (AIC) dentre 24 modelos testados.

Os parâmetros utilizados na análise e indicados pelo programa foram: *Substitution model* = GTR; *Number of substitution rates categories* = 4; *Gamma shape parameter (G)* = 0.7620; *Number of estimated parameters (K)* = 187; *Negative log likelihood (-lnL)* = 3850.0906.

A análise utilizando a região do Segundo Espaçador Interno Transcrito resultou no filograma consenso apresentado na Figura 14. O programa jModelTest v.0.1.1 indicou o modelo GTR+I+G (*General Time Reversible + Gamma distribution + Invariable Sites*) escolhido através do método *Akaike Information Criterion* (AIC) dentre 24 modelos testados.

Os parâmetros utilizados na análise e indicados pelo programa foram: *Substitution model* = GTR+I; *Number of substitution rates categories* = 4; *Gamma shape parameter (G)* = 1.5090; *Number of estimated parameters (K)* = 164; *Negative log likelihood (-lnL)* = 11372.8260.

A análise combinada utilizando as regiões do Citocromo C Oxidase Subunidade I + o Segundo Espaçador Interno Transcrito resultou em um filograma consenso representado na Figura 15. O programa jModelTest v.0.1.1 indicou o modelo HKY+G (*Hasegawa-Kishino-Yano + Gamma distribution*) escolhido através do método *Akaike Information Criterion* (AIC) dentre 24 modelos testados.

Os parâmetros utilizados na análise e indicados pelo programa foram: *Substitution model* = HKY; *Number of substitution rates categories* = 4; *Gamma shape parameter (G)* = 0.6210; *Number of estimated parameters (K)* = 115; *Negative log likelihood (-lnL)* = 4851.8759.

Os filogramas obtidos nas análises de máxima verossimilhança foram, de modo geral, semelhantes aos obtidos nas análises de máxima parcimônia, com exceção dos valores de suporte e algumas posições dos terminais que apresentaram conformidades diferentes nas suas topologias.

Como o ocorrido nas outras análises, as espécies foram separadas com sucesso nas análises de máxima verossimilhança, apresentando os mesmos fatos já discutidos e ocorridos

com os gêneros *Paralucilia*, *Lucilia* e *Ophyra*, dos quais se comportaram de forma semelhante na presente análise, somente variando com a região do DNA na qual estava sendo trabalhada.

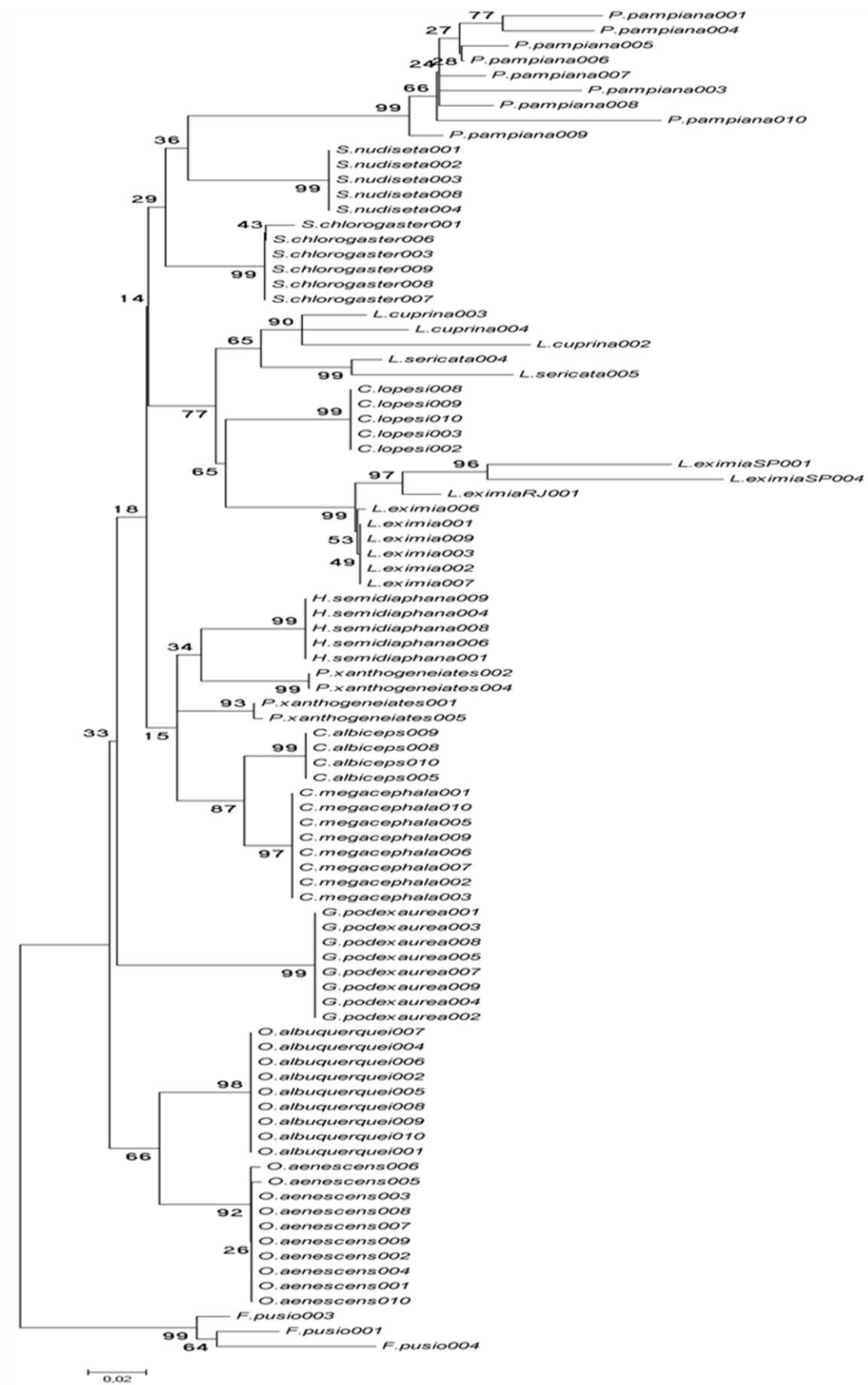
Chen *et al.* (2004) obtiveram resultados satisfatórios, utilizando análise de máxima verossimilhança, em um trabalho de identificação molecular de Calliphoridae de importância forense no Taiwan, trabalhando com a região COI do DNAm. O cladograma gerado apresentou um suporte de ramos bem elevado entre os clados e mostrou que as sequências dessa região se apresentaram bem conservadas e eficazes na identificação de espécies de interesse forense naquela localidade.

As Figuras 16, 17 e 18 mostram uma série de gráficos de distâncias pareadas entre as espécies nas análises com as regiões COI, ITS2 e COI+ITS2, respectivamente.

Os diferentes picos demonstrados nos gráficos e o grande espaço presente entre os picos exibem uma grande variação nas sequências dos nucleotídeos das duas espécies, permitindo assim que seja visualizada a sua diferenciação. O gráfico representado por *L. sericata* e *L. cuprina* na análise com o COI (Figura 16) apresenta um espaço entre os picos não tão evidente como nos outros gráficos do quadro, evidenciando a proximidade na frequência nucleotídica entre essas duas espécies. Os exemplares de *Paralucilia xanthogeneiates* representados nos gráficos exibem uma grande diferença entre as sequências dos exemplares analisados, confirmando a hipótese, já discutida nos filogramas, de se tratarem de duas espécies diferentes.

Na Figura 17 pode-se observar os gráficos referentes às análises com a região ITS2. A grande variação dos picos dentro dos exemplares da mesma espécie indica a grande variação intra-específica que essa região possui, dificultando a sua visualização em alguns pontos como, por exemplo, nos exemplares de *L. eximia* e *H. semidiaphana*. O gráfico representado pelas espécies do gênero *Ophyra*, como já observado nos filogramas, não mostra com clareza a separação das duas espécies do gênero, como também ocorre no gráfico representado por *L. cuprina* e *L. sericata*.

Os gráficos obtidos com a combinação dos dois genes (COI+ITS2 – Figura 18) evidenciam com mais clareza essa separação entre as espécies se comparados aos gráficos obtidos nas análises separadas. A combinação entre os dois genes, como já observado nos filogramas gerados pelas análises, se torna mais consistente e com maior suporte, dando maior credibilidade e confiabilidade nos resultados obtidos.



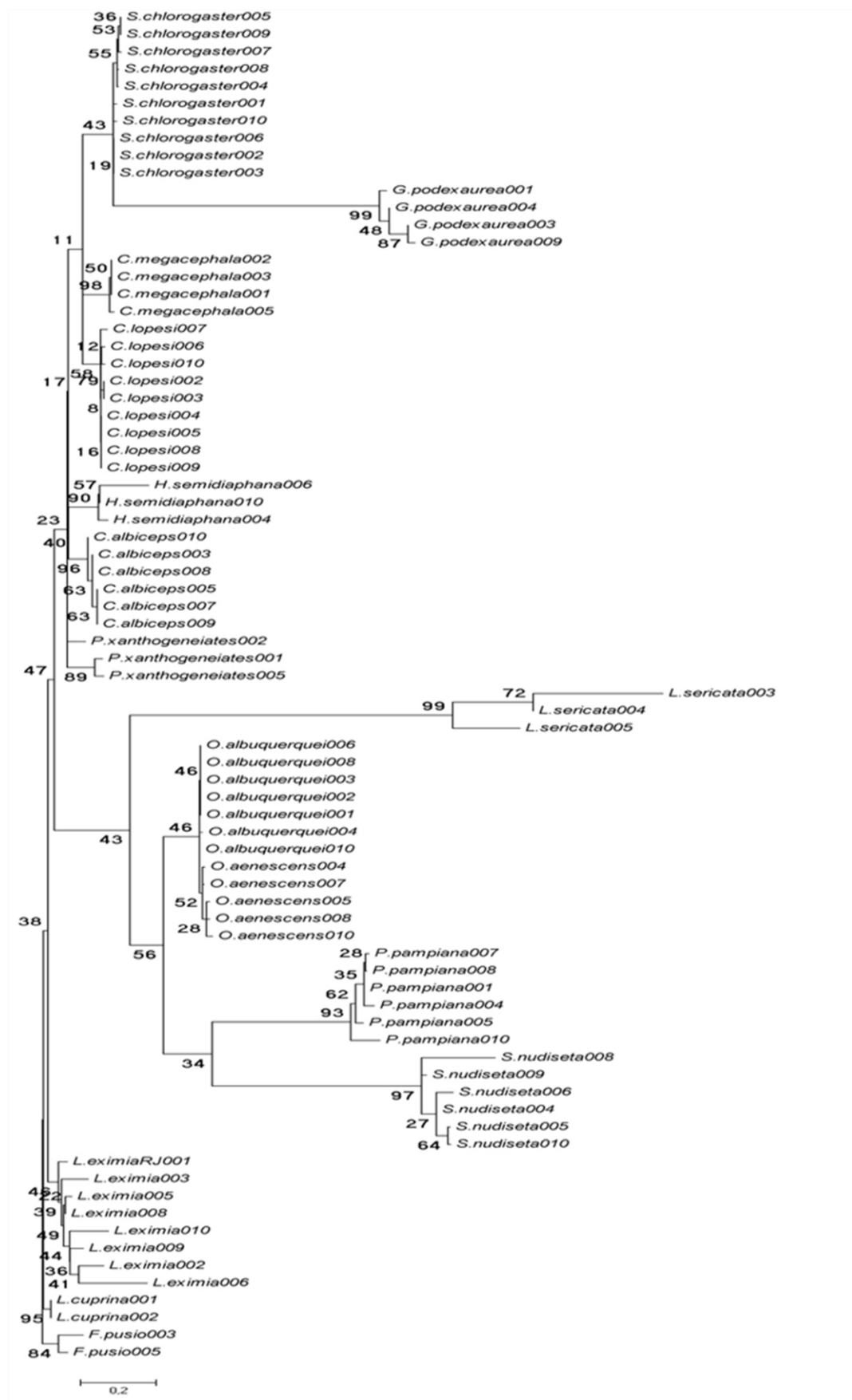


Figura 14 – Filograma consenso obtido por análise de máxima verossimilhança, utilizando sequencias da região do Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2). Modelo de substituição nucleotídica = GTR+I+G; $-\ln L = 11372.8260$. Valores dos ramos correspondem ao suporte por bootstrap (1000 replicações). Cada terminal corresponde a um indivíduo.

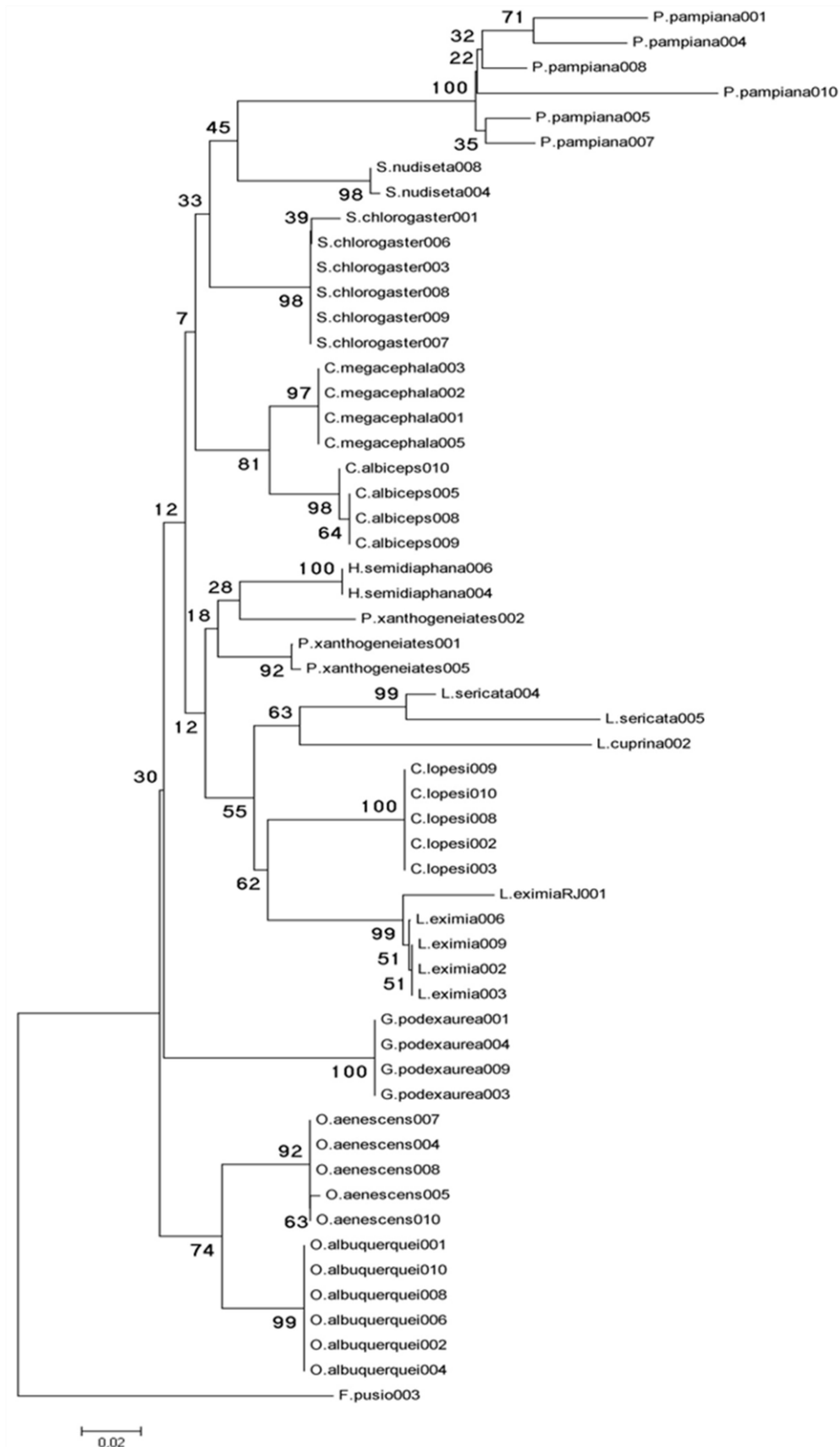


Figura 15 – Filograma consenso obtido por análise de máxima verossimilhança, utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I + Segundo Espaador Interno Transcrito (COI+ITS2). Modelo de substituição nucleotídica = HKY+G; -lnL= 4851.8759. Valores dos ramos correspondem ao suporte por bootstrap (1000 replicações). Cada terminal corresponde a um indivíduo.

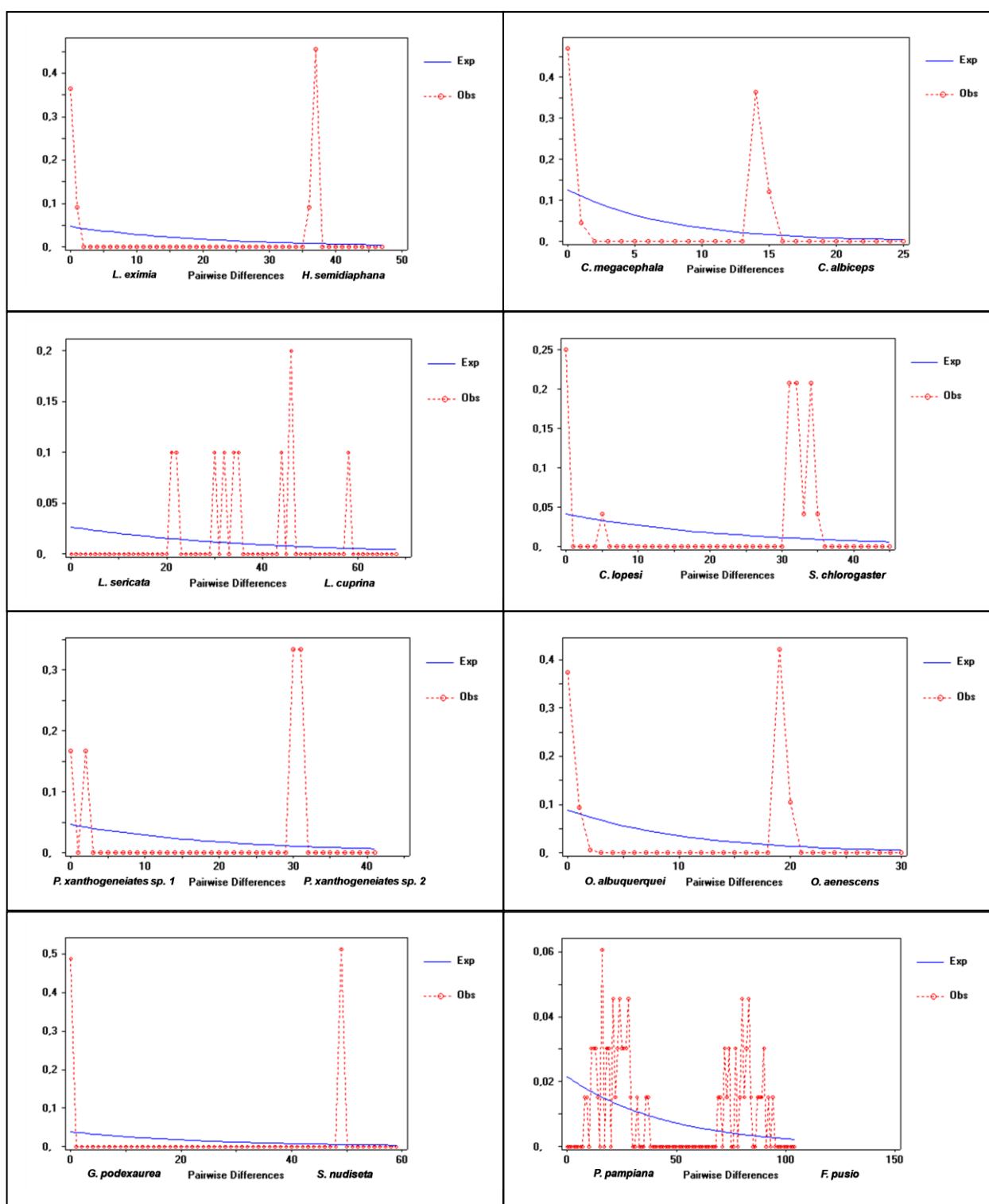


Figura 16 – Gráficos de distâncias pareadas (eixo x) e frequências nucleotídicas (eixo y), utilizando a região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) entre as espécies de Calliphoridae e Muscidae objetos de estudo do presente trabalho. Exp: valores esperados; Obs: valores observados.

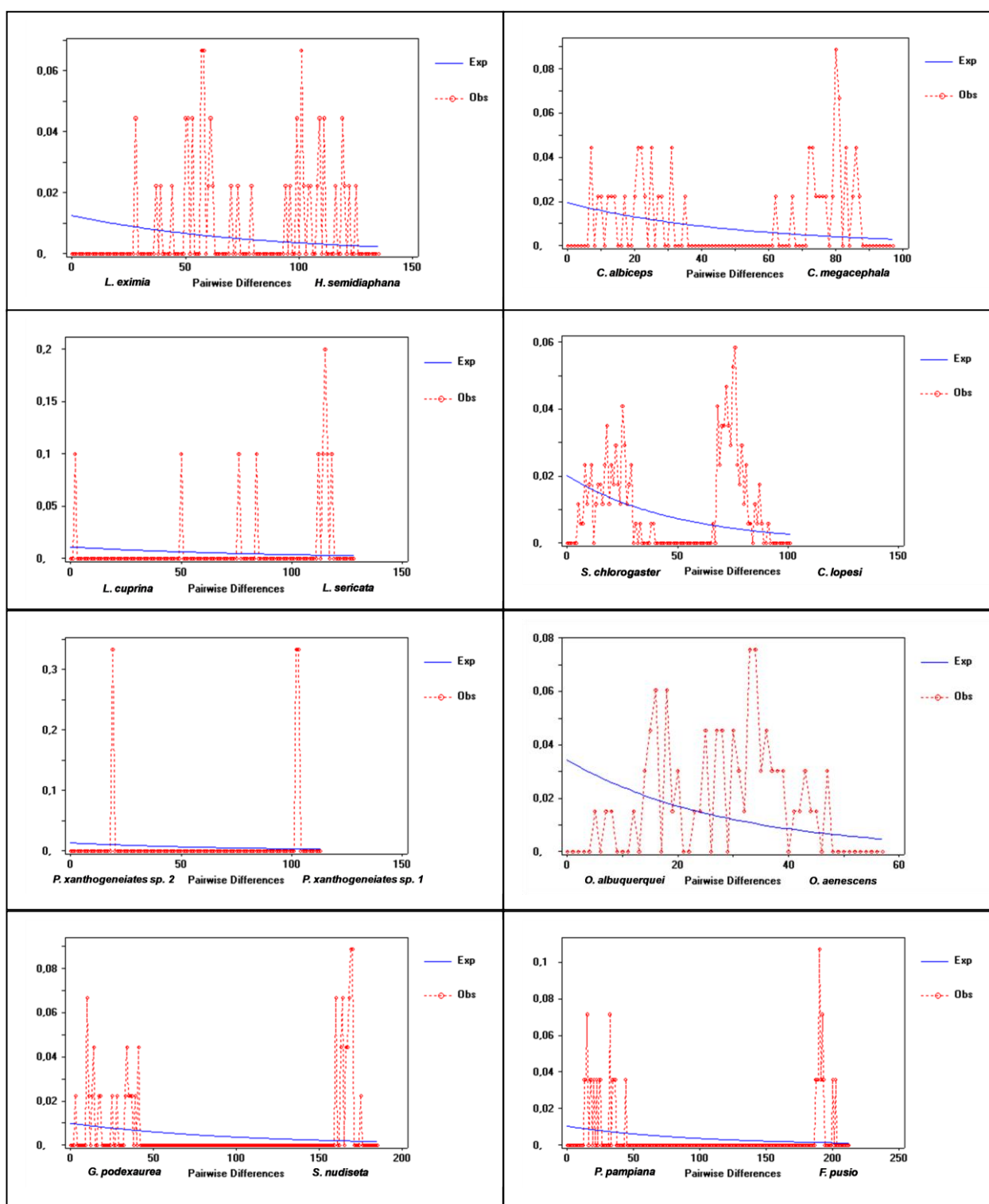


Figura 17 – Gráficos de distâncias pareadas (eixo x) e frequências nucleotídicas (eixo y), utilizando a região do Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2) entre as espécies de Calliphoridae e Muscidae objetos de estudo do presente trabalho. Exp: valores esperados; Obs: valores observados.

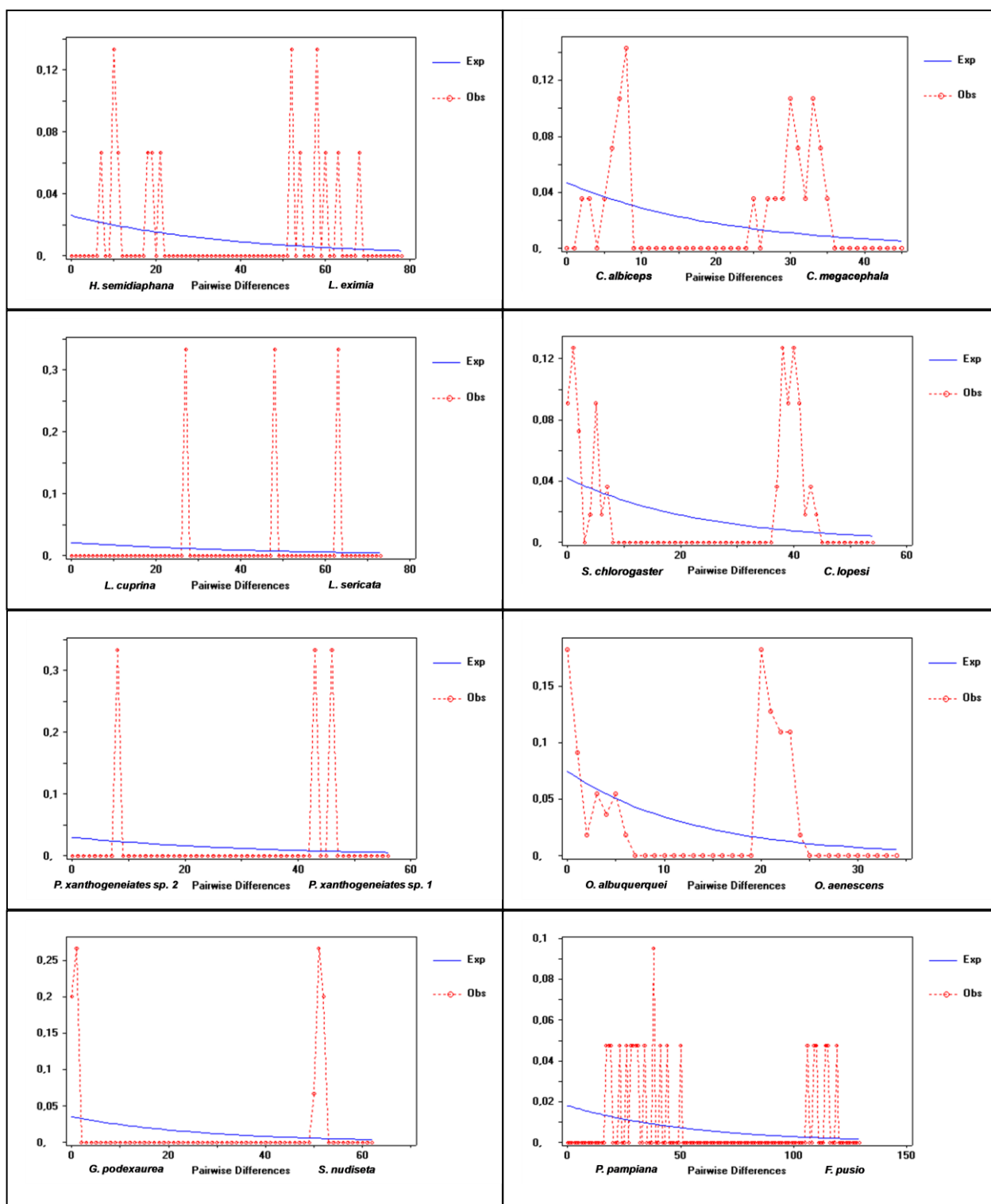


Figura 18 – Gráficos de distâncias pareadas (eixo x) e frequências nucleotídicas (eixo y), utilizando a região do Citocromo C Oxidase Subunidade I + Segundo Espaço Interno Transcrito (COI+ITS2) entre as espécies de Calliphoridae e Muscidae objetos de estudo do presente trabalho. Exp: valores esperados; Obs: valores observados.

5. CONCLUSÃO

A metodologia utilizada e proposta pelo sistema de identificação universal “*DNA Barcode*” foi eficiente na identificação da maioria das espécies de Calliphoridae e Muscidae, objetos de estudo do presente trabalho, sobretudo nos grupos com um maior número de estudos e taxonomicamente melhor revisados.

As regiões do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) e o Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2) se mostraram regiões de fácil amplificação e sequenciamento, podendo ambas serem utilizadas como complemento na identificação de dípteros de interesse forense, sobretudo se ambas forem utilizadas em conjunto, o que daria um maior suporte e consistência aos dados.

Os filogramas obtidos nas análises obtiveram um suporte de ramos satisfatório na diferenciação dos táxons terminais em todas as análises, sobretudo nas análises combinadas entre as duas regiões, separando as espécies em clados distintos e mostrando ser uma metodologia rápida e eficaz na identificação das espécies de interesse forense dos locais estudados.

Os exemplares de *Paralucilia xanthogeneiates* se comportaram nas análises como pertencentes a espécies diferentes, o que indica a necessidade de mais estudos com uma amostragem maior de exemplares e uma possível revisão do gênero. Os exemplares de *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata* e *Lucilia eximia* também se comportaram nas análises ocorrendo em clados diferentes e distantes, o que sugere a não monofilia do gênero e uma necessidade maior de estudos morfológicos e moleculares.

Devido a amostragem do estudo ter sido limitada a apenas uma região específica do país, com a inclusão de apenas alguns exemplares de outras regiões, se fazem necessários maiores estudos em outras localidades para que a mesma metodologia seja testada e se possível aplicada nas práticas de entomologia forense auxiliando e agilizando a identificação dos organismos encontrados em cenas de crimes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldrich, J. 1997. R.A. Fisher and the Making of Maximum Likelihood 1912-22. **Statistical Science**, 12: 162-176.
- Almeida, L.M.; C.S. de Ribeiro-Costa & L. Marinoni. 1998. **Manual de Coleta, Conservação, Montagem e Identificação de Insetos**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 78p.
- Altschul, S.F.; T.L. Madden; A.A. Schäffer; J. Zhang; Z. Zhang; W. Miller & D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25: 3389-3402.
- Amendt, J.; R. Krettek & R. Zehner. 2004. Forensic entomology. **Naturwissenschaften**, 91: 51-65.
- Amorim, D.S.; V.C. Silda & M.I.P.A. Balbi. 2002. Estado do conhecimento dos Diptera Neotropicais, p. 29-36. In: Costa, C.; S.A. Vanin; J.M. Lobo & A. Melic (eds). **Proyecto de Red Iberoamericano de Biogeografía y Entomología Sistemática PRIBES 2002**. Zaragoza. m3m-Monografias Tercer Milenio, vol. 2, 329p.
- Benecke, M. & J.D. Wells. 2000. DNA Techniques for Forensic Entomology. In: Byrd, J.H. & J.L. Castner. **Forensic entomology the utility of arthropods in legal investigations**. 2001. 43-79. CRC Boca Raton, FL.
- Benecke, M. 2004. Forensic Entomology: Arthropods and Corpses. In: Tsokos, M. (ed.) **Forensic Pathology Reviews** vol. 2, Humana Press, Totowa (NJ, USA), p. 207-240.
- Brammer, S.P. 2000. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 7p.
- Byrd, J.H. & J.L. Castner. 2010. **Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations**. CRC Boca Raton, FL, USA. 2. ed.

- Cainé, L.M.; F.C. Real; M.I. Saloña-Bordas; M.M. de Pancorbo; G. Lima; T. Magalhães & F. Pinheiro. 2009. DNA typing of Diptera collected from human corpses in Portugal. **Forensic Science International**, 184: 21-23.
- Carpenter, J.M. 1988. Choosing among multiple equally parsimonious cladograms. **Cladistics**, 4: 291-296.
- Carvalho, C.J.B. de & P.B. Ribeiro. 2000. Chave para a identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 9: 169-173.
- Carvalho, C. J. B. de. (ed). 2002. **Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: Taxonomy**. Curitiba, Editora Universidade Federal do Paraná, 287p.
- Carvalho, C.J.B. de; M.O. Moura & P.B. Ribeiro. 2002a. Chave para adultos de dípteros (Muscidae: Fanniidae: Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, 46: 107-114.
- Carvalho, C.J.B. de; M.S. Couri; R. Toma; J.A. Rafael; A.Y. Harada; S.R. Bonatto; A.L. Loureiro & H.A. de O. Gastal. 2002b. **Principais coleções brasileiras de Diptera: Histórico e Situação atual**, p. 37-52. In: Costa, C.; S.A. Vanin; J.M. Lobo & A. Melic.. Proyecto de Red Iberoamericano de Biogeografía Y Entomología Sistemática PRIBES 2002. m3m-Monografías Tercer Milenio, vol. 2. Sociedad (SEA) & Cited, Zaragoza, 329p.
- Carvalho, C.J.B. de; M.S. Couri; A.C. Pont; D.M. Pamplona & S.M. Lopes. 2005. A Catalogue of the Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region. **Zootaxa**, 860: 1-282.
- Carvalho, C.J.B. de & C.A. Mello-Patiu. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia**, 52: 390-406.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, 17: 540-552.

- Catts, E.P. & N.E. Haskell. 1990. **Entomology & Death: A procedural guide**. Clemson: Joyce's Print Shop, 182p.
- Chen, W.Y.; T.H. Hung & S.F. Shiao. 2004. Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. **Journal of Medical Entomology**, 41: 47–57.
- Chen, S.; H. Yao; J. Han; C. Liu; J. Song; L. Shi; Y. Zhu; X. Ma; T. Gao; X. Pang; K. Luo; Y. Li; X. Li; X. Jia; Y. Lin & C. Leon. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA Barcode for identifying medicinal plant species. **PLoS ONE**, 5: 8613.
- Coleman, A.W. 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote revolutionary comparisons. **Trends in Genetics**, 19: 370-375.
- Couri, M.S. & C.J.B. de Carvalho. 2005. Diptera muscidae do estado do Rio de Janeiro (Brasil). **Biota Neotropica**, 5: 205-222.
- Dear, J.P. 1985. A revision of the New World Chrysomyini (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 3: 109-169.
- Evenhuis, N.L.; T. Pape; A.C. Pont & F.C. Thompson. 2010. **Biosystematic Database of World Diptera**, Version 1.5. Disponível em: <<http://www.diptera.org/biosys.htm>>. Acesso em Setembro de 2010.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, 39: 783-791.
- Ferreira, M.E. & D. Grattapaglia. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p.
- Goff, M.L.; A.I. Omori & K. Gunatilake. 1988. Estimation of postmortem interval by arthropod succession: three cases studies from the Hawaiian Islands. **American Journal of Forensic Medical & Pathology**, 9: 220-225.

- Greenberg, B. & T.I. Tantawi. 1993. Different developmental strategies in two boreal blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology**, 30: 481-484.
- Guindon, S. & O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, 52: 696-704.
- Gunn, A. 2009. **Essential forensic biology**. Liverpool, U.K. Wiley-Blackwell - John Wiley & Sons, Ltd. 2 ed.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41: 95-98.
- Hebert, P.D.N. & T.R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, 54: 852-859.
- Hillis, D.M. & Dixon, M.T. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, 66: 411-453.
- Holland, M.M. & T.J. Parsons. 1999. Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. **Forensic Science Review**, 11: 21-50.
- Huckett, H.C. & J.R. Vockeroth. 1987. Muscidae, p. 1115-1131. In: J. F. McAlpine (Ed.). **Manual of Nearctic Diptera**. Ottawa, Research Branch Agriculture Canada, II+657-1332p.
- Huson, D.H.; D.C. Richter; C. Rausch; T. DeZulian; M. Franz & R. Rupp. 2007. Dendroscope - An interactive viewer for large phylogenetic trees. **BMC Bioinformatics**, 8: 460.
- IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná. 2010. Cartas climáticas do Paraná. In: Caviglione, J.H.; L.R.B. Kiihl, P.H. Caramori & D. Oliveira. **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2000. CD. Disponível em: <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=677>>. Acesso em Agosto de 2010.

IUPAC – **International Union of Pure and Applied Chemistry**. Disponível em:
<<http://www.iupac.org/>>. Acesso em Agosto de 2010.

Jukes, T.H. & C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro H.N., editor, **Mammalian Protein Metabolism**, Academic Press, New York. p. 21-132.

Keh, B. 1985. Scope and applications of forensic entomology. **Annual Review Entomology**, 30: 137–154.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16: 111-120.

Kosmann, C. 2009. Código de barras (DNA *barcode*) de dípteros de interesse forense. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR.

Kumar, S.; J. Dudley; M. Nei & K. Tamura. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, 9: 299-306.

Larkin, M.A.; G. Blackshields; N.P. Brown; R. Chenna; P.A. McGettigan; H. McWilliam; F. Valentin; I.M. Wallace; A. Wilm; R. Lopez; J.D. Thompson; T.J. Gibson & D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23: 2947-2948.

LBGM – Laboratório de Biologia Genômica e Molecular. 2010. **Protocolo para purificação e sequenciamento de amostras**. Disponível em:
<<http://www.pucrs.br/fabio/labs/genoma/protocolos/UltimoPurifSeqCBGMPUCRS.pdf>>. Acesso em Agosto de 2010.

Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25: 1451-1452.

- Löytynoja, A. & N. Goldman. 2005. An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 102: 10557-10562.
- Löytynoja, A. & N. Goldman. 2008. Phylogeny-aware gap placement prevents errors in sequence alignment and evolutionary analysis. **Science**, 320: 1632-1635.
- Malgorn, Y. & R. Coquoz. 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae. An interest in forensic entomology. **Forensic Science International**, 102: 111-119.
- Marchenko, M.I. 2001. Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death. **Forensic Science International**, 120: 89–109.
- Marinho, C.R.; L.S. Barbosa; A.C.G. Azevedo; M.M.C. Queiroz; M.A. Valgode & V.M. Aguiar-Coelho. 2006. Diversity of Calliphoridae (Diptera) in Brazil's Tinguá Biological Reserve. **Brazilian Journal of Biology**, 66: 95-100.
- Marques, B. & M.S. Couri. 2007. Taxonomia e morfologia das espécies neotropicais de *Graphomya* Robineau-Desvoidy (Diptera, Muscidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 51: 436–444.
- Matsumoto, Y; T. Yanase; T. Tsuda & H. Noda. 2009. Characterization of internal transcribed spacer (ITS1)-ITS2 region of ribosomal RNA gene from 25 species of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Japan. **Journal of Medical Entomology**, 46: 1099-1108.
- Mello, R.P. 2003. Chave para a identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorhapha) encontradas no Brasil. **Entomologia y Vectores**, 10: 255-268.
- Milach, S.C.K. 1998. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 5: 14-17.

- Moore, J. 2006. The pattern of evolution: methods of investigation. In: Moore, J. (ed). **An Introduction to the Invertebrates**. New York. Cambridge University Press. 2 ed.
- Morris, B. & I.R. Dadour. 2005. Forensic Entomology: The Use of Insects in Legal Cases. In: I. Freckelton & H. Selby, editors, **Expert Evidence**, Thomson Publishing Services, Andover, UK.
- Moura, M.O.; C.J.B. de Carvalho & E.L.A. Monteiro-filho. 1997. A Preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, state of Paraná. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 92: 269-274.
- NCBI – **BLAST: Basic Local Alignment Search Tool**. 2010. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em Agosto de 2010.
- Nei, M. & S. Kumar. 2000. Close-Neighbor-Interchange. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press, New York.
- Nelson, L.A.; J.F. Wallman & M. Downton. 2007. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. **Medical and Veterinary Entomology**, 21: 44-52.
- Nelson, L.A.; J.F. Wallman & M. Downton. 2008. Identification of forensically important *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) species using the second ribosomal internal transcribed spacer (ITS2). **Forensic Science International**, 177: 238-247.
- Oliveira-Costa, J. 2007. A entomologia forense e suas aplicações, p. 39-48. In: Oliveira-Costa, J. **Entomologia forense – quando os insetos são vestígios**. Campinas, SP: Millennium Editora, 2. ed.
- Otranto, D. & J.R. Stevens. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. **International Journal of Parasitology**, 32: 1345-1360.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, 12: 357-358.

- Paskewitz, S.M.; D.M. Wesson & F.H. Collins. 1993. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of *Anopheles gambiae* species complex. **Insect Molecular Biology**, 2: 247- 257.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, 25: 1253-1256.
- Pujol-Luz, J.R.; H. Marques; A. Ururahy-Rodrigues; J.A. Rafael; F.H. Santana; L.C. Arantes & R. Constantino. 2006. A forensic entomology case from the Amazon rain forest of Brazil. **Journal of Forensic Sciences**, 51: 1151–1153.
- Rafael, J.A. 2002. A Amostragem: Protocolo e técnicas de captura de Díptera. In: **Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática** PrIBES 2002 m3m-Monografías Tercer Milenio, vol. 2. Sociedade Entomológica Aragonesa (SEA) & Cytel, Zaragoza, 329p.
- Rambaut, A. 2009. Tree Figure Drawing Tool Version 1.3.1. **Institute of Evolutionary Biology**, University of Edinburgh, USA.
- Reginato, M.; F.B. Matos, G.S. Lindoso, C.M.F. Souza, J.A. Prevedello, J.W. Morais & P.H.L. Evangelista. 2008. A vegetação na Reserva Mata Viva, Curitiba, Paraná, Brasil. **Acta Biológica Paranaense**, 37: 229-252.
- Ribeiro, P.B. & C.J.B. de Carvalho. 1998. Pictorial key to Calliphoridae genera (Diptera) in southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, 7: 137-140.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4: 406–425.
- Shewell, G.E. 1987. Calliphoridae, p. 1133–1145. In: J. F. McAlpine (Ed.). **Manual of Nearctic Diptera**. Ottawa, Research Branch Agriculture Canada, II+657-1332p.
- Smith, K.G.V. 1986. **A manual of forensic entomology**. British Museum, London. 205p.

- Song, Z.K.; X.Z. Wang & G.Q. Liang. 2008a. Species identification of some common necrophagous flies in Guangdong province, southern China based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). **Forensic Science International**, 175: 17-22.
- Song, Z.K.; X.Z. Wang & G.Q. Liang. 2008b. Molecular evolution and phylogenetic utility of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) in Calyptratae (Diptera: Brachycera). **Journal of Molecular Evolution**, 67: 448-64.
- Sperling, F.A.H., G.S. Anderson & D.A. Hickey. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for post-mortem interval estimation. **Journal of Forensic Sciences**, 39: 418-427.
- Staden, R.; K.F. Beal & J.K. Bonfield. 2010. **Standen Package**. Disponível em: <<http://staden.sourceforge.net/>>. Acesso em Agosto de 2010.
- Talavera, G. & J. Castresana. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, 56: 564-577.
- Tamura K.; J. Dudley; M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, 24: 1596-1599.
- Thyssen, P.J. 2005. Caracterização das formas imaturas e determinação das exigências térmicas de duas espécies de califorídeos (Diptera) de importância forense. **Tese de doutoramento**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.
- Thyssen, P.J.; A. C. Lessinger; A.M.L. Azeredo-Espin & A.X. Linhares. 2005. The value of PCR-RFLP molecular markers for the differentiation of immature stages of two necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae) of potential forensic importance. **Neotropical Entomology**, 34: 777-784.

- Thyssen, P.J. 2007. A aplicação da análise molecular na entomologia forense. In: Oliveira-Costa, J. (ed). **Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios**. Campinas. Millennium Editora. xix + 420p.
- Vianna, E.E.S.; P.R.P. Costa; A.L. Fernandes & P.B. Ribeiro. 2004. Abundância e flutuação populacional das espécies de *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Série Zoologia**, 94: 231-234.
- Wallman, J.F. & S.C. Donnellan. 2001. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. **Forensic Science International**, 120: 60–67.
- Wells, J.D. & F.A.H. Sperling. 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). **Forensic Science International**, 120: 110–115.
- Wells, J.D.; R. Wall & J.R. Stevens. 2007. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. **International Journal of Legal Medicine**, 121: 229–233.
- Wells, J.D. & D.W. Williams. 2007. Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. **International Journal of Legal Medicine**, 121: 1137–1596.
- Wilkerson, R.C.; J.F. Reinert & C. Li. 2004. Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiate six species in the *Anopheles crucians* Complex. **Journal of Medical Entomology**, 41: 392-401.
- Wolff, M.; A. Uribe, A. Ortiz & P. Duque. 2001. A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. **Forensic Science International**, 120: 53-59.
- Zhang, D.X. & G.M. Hewitt. 1997. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, 25: 99-120.

7. ANEXOS

Tabela 2. Relação das espécies e respectivos exemplares sequenciados: Local e data da coleta, espécie e código do exemplar, concentração e pureza total dos nucleotídeos.

Localidade	Data da Coleta	Espécie	Código da Amostra	Concentração DNA Total (ng/μl)	Pureza DNA Total
Curitiba-PR	13.viii.2009	<i>Lucilia eximia</i>	LEX 001	32,9	2,1
Curitiba-PR	13.viii.2009	<i>Lucilia eximia</i>	LEX 002	9	2,76
Curitiba-PR	13.viii.2009	<i>Lucilia eximia</i>	LEX 003	22,5	3,69
Curitiba-PR	13.viii.2009	<i>Lucilia eximia</i>	LEX 004	25,6	3,57
Curitiba-PR	11.viii.2009	<i>Lucilia eximia</i>	LEX 005	18,8	3,58
Curitiba-PR	11.viii.2009	<i>Lucilia eximia</i>	LEX 006	16,2	2,89
Curitiba-PR	11.viii.2009	<i>Lucilia eximia</i>	LEX 007	11,5	3,07
Curitiba-PR	29.vii.2009	<i>Lucilia eximia</i>	LEX 008	6	2,5
Curitiba-PR	06.v.2009	<i>Lucilia eximia</i>	LEX 009	4,8	2,88
Curitiba-PR	06.v.2009	<i>Lucilia eximia</i>	LEX 010	67	2,31
Curitiba-PR	16.iv.2009	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	SCH 001	20,8	2,58
Curitiba-PR	16.iv.2009	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	SCH 002	197,3	2,02
Curitiba-PR	16.iv.2009	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	SCH 003	18,6	2,44
Curitiba-PR	21.x.2009	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	SCH 004	5,5	1,74
Curitiba-PR	21.x.2009	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	SCH 005	12,4	2,72
Curitiba-PR	21.x.2009	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	SCH 006	27,3	2,38
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	SCH 007	43,7	2,37
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	SCH 008	15,8	2,65
Curitiba-PR	14.ix.2009	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	SCH 009	8,2	2,54
Curitiba-PR	06.v.2009	<i>Sarconesia chlorogaster</i>	SCH 010	372	2,15
Curitiba-PR	13.iv.2009	<i>Chrysomya albiceps</i>	CAL 001	11,4	2,02
Curitiba-PR	13.iv.2009	<i>Chrysomya albiceps</i>	CAL 002	32,3	2,45
Curitiba-PR	04.v.2009	<i>Chrysomya albiceps</i>	CAL 003	36,4	2,37
Curitiba-PR	04.v.2009	<i>Chrysomya albiceps</i>	CAL 004	13,5	2,14
Curitiba-PR	21.v.2009	<i>Chrysomya albiceps</i>	CAL 005	10,7	2,54
Curitiba-PR	05.viii.2009	<i>Chrysomya albiceps</i>	CAL 006	26,5	2,2
Curitiba-PR	05.viii.2009	<i>Chrysomya albiceps</i>	CAL 007	44,3	2,56
Curitiba-PR	05.viii.2009	<i>Chrysomya albiceps</i>	CAL 008	17,9	2,55
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Chrysomya albiceps</i>	CAL 009	17	2,14
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Chrysomya albiceps</i>	CAL 010	14,9	1,91
Curitiba-PR	15.iv.2009	<i>Chrysomya megacephala</i>	CME 001	21	2,08
Curitiba-PR	12.v.2009	<i>Chrysomya megacephala</i>	CME 002	40,9	2,01
Curitiba-PR	21.viii.2009	<i>Chrysomya megacephala</i>	CME 003	643,1	2,21
Curitiba-PR	21.viii.2009	<i>Chrysomya megacephala</i>	CME 004	28,8	2,14
Curitiba-PR	21.viii.2009	<i>Chrysomya megacephala</i>	CME 005	658,7	2,21
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Chrysomya megacephala</i>	CME 006	481,7	2,18
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Chrysomya megacephala</i>	CME 007	7,3	3,18
Curitiba-PR	14.ix.2009	<i>Chrysomya megacephala</i>	CME 008	3,6	3,6
Curitiba-PR	14.ix.2009	<i>Chrysomya megacephala</i>	CME 009	8,7	3,64
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Chrysomya megacephala</i>	CME 010	9,4	2,55
Curitiba-PR	21.v.2009	<i>Paralucilia xanthogeneiates</i>	PXA 001	3,8	6,59
Curitiba-PR	05.viii.2009	<i>Paralucilia xanthogeneiates</i>	PXA 002	184,5	2,28
Curitiba-PR	05.viii.2009	<i>Paralucilia xanthogeneiates</i>	PXA 003	8,9	5,85
Curitiba-PR	15.ix.2009	<i>Paralucilia xanthogeneiates</i>	PXA 004	62,1	2,33
Curitiba-PR	15.ix.2009	<i>Paralucilia xanthogeneiates</i>	PXA 005	7	3,99

Curitiba-PR	06.v.2009	<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	HSE 001	2,1	1,87
Curitiba-PR	06.v.2009	<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	HSE 002	5,7	1,87
Curitiba-PR	06.v.2009	<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	HSE 003	1,9	1,9
Curitiba-PR	29.viii.2009	<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	HSE 004	3	1,73
Curitiba-PR	29.viii.2009	<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	HSE 005	5,1	2,07
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	HSE 006	7,1	2,14
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	HSE 007	2,9	1,65
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	HSE 008	4,5	1,98
Curitiba-PR	18.ix.2009	<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	HSE 009	6,4	2,05
Curitiba-PR	18.ix.2009	<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	HSE 010	16,6	1,91
Curitiba-PR	12.v.2009	<i>Calliphora lopesi</i>	CLO 001	9,6	1,48
Curitiba-PR	12.v.2009	<i>Calliphora lopesi</i>	CLO 002	59,4	2,07
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Calliphora lopesi</i>	CLO 003	12,1	1,72
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Calliphora lopesi</i>	CLO 004	88,5	2,09
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Calliphora lopesi</i>	CLO 005	51,5	2,06
Curitiba-PR	13.viii.2009	<i>Calliphora lopesi</i>	CLO 006	17,9	1,62
Curitiba-PR	13.viii.2009	<i>Calliphora lopesi</i>	CLO 007	18,5	1,56
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Calliphora lopesi</i>	CLO 008	26,7	1,72
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Calliphora lopesi</i>	CLO 009	288,1	2,21
Curitiba-PR	25.x.2009	<i>Calliphora lopesi</i>	CLO 010	46,2	2,04
Curitiba-PR	25.x.2009	<i>Ophyra albuquerquei</i>	OAL 001	512,1	2,15
Curitiba-PR	25.x.2009	<i>Ophyra albuquerquei</i>	OAL 002	59,9	2,06
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Ophyra albuquerquei</i>	OAL 003	74,6	2,13
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Ophyra albuquerquei</i>	OAL 004	10,3	1,67
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Ophyra albuquerquei</i>	OAL 005	599,5	2,17
Curitiba-PR	11.viii.2009	<i>Ophyra albuquerquei</i>	OAL 006	15	1,88
Curitiba-PR	11.viii.2009	<i>Ophyra albuquerquei</i>	OAL 007	47,2	1,97
Curitiba-PR	11.viii.2009	<i>Ophyra albuquerquei</i>	OAL 008	70,3	2,09
Curitiba-PR	21.viii.2009	<i>Ophyra albuquerquei</i>	OAL 009	149,2	2,14
Curitiba-PR	21.viii.2009	<i>Ophyra albuquerquei</i>	OAL 010	8,6	2,01
Curitiba-PR	21.v.2009	<i>Ophyra aenescens</i>	OAE 001	8,8	1,82
Curitiba-PR	21.v.2009	<i>Ophyra aenescens</i>	OAE 002	144,6	2,18
Curitiba-PR	21.v.2009	<i>Ophyra aenescens</i>	OAE 003	19,4	1,89
Curitiba-PR	04.v.2009	<i>Ophyra aenescens</i>	OAE 004	6,2	2,02
Curitiba-PR	04.v.2009	<i>Ophyra aenescens</i>	OAE 005	23,9	2,06
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Ophyra aenescens</i>	OAE 006	22,3	1,85
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Ophyra aenescens</i>	OAE 007	9,3	1,9
Curitiba-PR	25.x.2009	<i>Ophyra aenescens</i>	OAE 008	12,1	1,62
Curitiba-PR	25.x.2009	<i>Ophyra aenescens</i>	OAE 009	123,9	2,13
Curitiba-PR	25.x.2009	<i>Ophyra aenescens</i>	OAE 010	9,3	1,54
Curitiba-PR	21.v.2009	<i>Graphomya podexaurea</i>	GPO 001	9	1,35
Curitiba-PR	21.v.2009	<i>Graphomya podexaurea</i>	GPO 002	4	1,06
Curitiba-PR	12.v.2009	<i>Graphomya podexaurea</i>	GPO 003	3,6	1,2
Curitiba-PR	12.v.2009	<i>Graphomya podexaurea</i>	GPO 004	4,9	1,09
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Graphomya podexaurea</i>	GPO 005	9,1	1,65
Curitiba-PR	02.ix.2009	<i>Graphomya podexaurea</i>	GPO 006	6,7	1,57
Curitiba-PR	25.x.2009	<i>Graphomya podexaurea</i>	GPO 007	7	1,51
Curitiba-PR	25.x.2009	<i>Graphomya podexaurea</i>	GPO 008	6,7	1,3
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Graphomya podexaurea</i>	GPO 009	4,7	1,57
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Graphomya podexaurea</i>	GPO 010	4,4	1,61

Curitiba-PR	11.viii.2009	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	SNU 001	72	2,21
Curitiba-PR	11.viii.2009	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	SNU 002	3,1	1,52
Curitiba-PR	11.viii.2009	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	SNU 003	2,8	5,16
Curitiba-PR	25.x.2009	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	SNU 004	5,1	1,85
Curitiba-PR	25.x.2009	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	SNU 005	28,6	1,98
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	SNU 006	10,3	1,77
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	SNU 007	3,3	1,26
Curitiba-PR	13.viii.2009	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	SNU 008	5,8	1,82
Curitiba-PR	13.viii.2009	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	SNU 009	2,6	2,33
Curitiba-PR	05.viii.2009	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	SNU 010	184,4	2,14
Curitiba-PR	21.viii.2009	<i>Psilochaeta pampiana</i>	PPA 001	11,4	2,1
Curitiba-PR	21.viii.2009	<i>Psilochaeta pampiana</i>	PPA 002	4,9	1,4
Curitiba-PR	29.viii.2009	<i>Psilochaeta pampiana</i>	PPA 003	335,9	2,14
Curitiba-PR	29.viii.2009	<i>Psilochaeta pampiana</i>	PPA 004	6,1	1,62
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Psilochaeta pampiana</i>	PPA 005	7,6	1,35
Curitiba-PR	16.ix.2009	<i>Psilochaeta pampiana</i>	PPA 006	23,7	1,52
Curitiba-PR	13.viii.2009	<i>Psilochaeta pampiana</i>	PPA 007	3,2	2,23
Curitiba-PR	13.viii.2009	<i>Psilochaeta pampiana</i>	PPA 008	4,5	1,72
Curitiba-PR	13.viii.2009	<i>Psilochaeta pampiana</i>	PPA 009	461,2	2,1
Curitiba-PR	25.x.2009	<i>Psilochaeta pampiana</i>	PPA 010	6,8	1,42
Ilha Grande-RJ	?viii.2007	<i>Lucilia eximia</i>	LERJ001	14,7	1,88
Ilha Grande-RJ	?viii.2007	<i>Lucilia eximia</i>	LERJ002	11,9	1,83
Ilha Grande-RJ	?viii.2007	<i>Lucilia eximia</i>	LERJ003	15,7	1,6
Ilha Grande-RJ	?viii.2007	<i>Lucilia eximia</i>	LERJ004	18,2	1,67
Ilha Grande-RJ	?viii.2007	<i>Lucilia eximia</i>	LERJ005	12,6	1,72
Botucatu-SP	10.iii.2010	<i>Lucilia eximia</i>	LESP001	34,4	2,38
Botucatu-SP	10.iii.2010	<i>Lucilia eximia</i>	LESP002	180,7	2,24
Botucatu-SP	10.iii.2010	<i>Lucilia eximia</i>	LESP003	79,1	2,24
Botucatu-SP	10.iii.2010	<i>Lucilia eximia</i>	LESP004	55,9	2,13
Botucatu-SP	10.iii.2010	<i>Lucilia eximia</i>	LESP005	37,2	2,33
Botucatu-SP	?vi.2009	<i>Lucilia cuprina</i>	LCU001	17,3	2,42
Botucatu-SP	?vi.2009	<i>Lucilia cuprina</i>	LCU002	13,5	2,62
Botucatu-SP	?vi.2009	<i>Lucilia cuprina</i>	LCU003	12,1	2,2
Botucatu-SP	?vi.2009	<i>Lucilia cuprina</i>	LCU004	10	2,48
Botucatu-SP	?vi.2009	<i>Lucilia sericata</i>	LSE001	26,2	2,41
Botucatu-SP	?vi.2009	<i>Lucilia sericata</i>	LSE002	17,5	2,38
Botucatu-SP	?vi.2009	<i>Lucilia sericata</i>	LSE003	7,1	2,95
Botucatu-SP	?vi.2009	<i>Lucilia sericata</i>	LSE004	20,9	2,93
Botucatu-SP	?vi.2009	<i>Lucilia sericata</i>	LSE005	126,6	2,05
Curitiba-PR	?viii.2006	<i>Fannia pusio</i>	FPU001	5	3,97
Curitiba-PR	?viii.2006	<i>Fannia pusio</i>	FPU002	4,6	2,77
Curitiba-PR	?viii.2006	<i>Fannia pusio</i>	FPU003	3,1	2,34
Curitiba-PR	?viii.2006	<i>Fannia pusio</i>	FPU004	5,2	3,33
Curitiba-PR	?viii.2006	<i>Fannia pusio</i>	FPU005	6	2,98